

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
3. Juli 2003 (03.07.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/054189 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/14302

(22) Internationales Anmeldedatum:
16. Dezember 2002 (16.12.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 63 161.8 20. Dezember 2001 (20.12.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): SUNGENE GMBH & CO. KGAA [DE/DE]; Cor-
rensstrasse 3, 06466 Gatersleben (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BIESGEN, Christian
[DE/DE]; Reichenstr. 29, 06484 Quedlinburg (DE).

(74) Anwalt: BIEBERBACH, Andreas; BASF Aktienge-
sellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

WO 03/054189 A2

(54) Title: METHODS FOR THE TRANSFORMATION OF VEGETAL PLASTIDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR TRANSFORMATION VON PFLANZLICHEN PLASTIDEN

(57) Abstract: The invention relates to novel methods for the production of transgenic plants with genetically modified plastids, in addition to transgenic plants produced according to said method.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft neue Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen mit gentechnisch veränderten Plastiden sowie die mit diesen Verfahren hergestellten transgenen Pflanzen.

BEST AVAILABLE COPY

Verfahren zur Transformation von pflanzlichen Plastiden

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen mit gentechnisch veränderten Plastiden sowie die mit diesen Verfahren hergestellten transgenen Pflanzen.

- 10 Ziel biotechnologischer Arbeiten an Pflanzen ist die Herstellung von Pflanzen mit vorteilhaften, neuen Eigenschaften zum Beispiel zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität, zur Qualitätssteigerung bei Nahrungsmitteln oder zur Produktion bestimmter Chemikalien oder Pharmazeutika.

15

Plastiden stellen Organellen innerhalb pflanzlicher Zellen mit einem eigenen Genom dar. Sie haben eine wesentliche Funktion in der Photosynthese sowie der Aminosäure- und Lipidbiosynthese. Das Genom der Plastiden besteht aus einer doppelsträngigen,

- 20 zirkulären DNA mit einer durchschnittlichen Größe von 120 bis 160 kb und liegt - zum Beispiel in Blattzellen - mit ca. 1900 bis 50000 Kopien pro Zelle vor (Palmer (1985) Ann Rev Genet 19:325-54). Ein einzelnes Plastid trägt dabei eine Kopienzahl von ca. 50 bis 100. Der Begriff der Plastiden umfasst Chloroplasten, 25 Proplastiden, Etioplasten, Chromoplasten, Amyloplasten, Leukoplasten und Elaioplasten (Heifetz P (2000) Biochimie 82:655-666). Die verschiedenen Formen sind in einander überführbar und entstehen alle aus den Proplastiden. Daher enthalten alle Ausprägungsformen der Plastiden die gleiche Erbinformation. Bevorzugt werden in der Literatur jedoch grüne Zellen, die Chloroplasten als Ausprägungsform enthalten, als Ausgangsmaterial für 30 die Transformation von Plastiden genutzt.

Es ist für die Pflanzenbiotechnologie von großem wirtschaftlichen 35 Interesse, effiziente Methoden für die Plastidentransformation zu entwickeln (McFadden G (2001) Plant Physiol. 125:50-53). Die stabile Transformation von Plastiden höherer Pflanzen gehört dabei zu den großen Herausforderungen.

- 40 Die bei der Insertion in die nukleäre DNA oft angewandte Technik der ungezielten (illegitimen) DNA-Insertion haben bei der Plastidentransformation den Nachteil, dass mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auf dem gendichten plastidären Genom ein essentielles Gen getroffen wird, was häufig letal für die Pflanze 45 wäre. In Plastiden ist daher eine gezielte Insertion von Fremd-DNA vorteilhaft.

Verschiedene Verfahren zur gezielten Insertion in das plastidäre Genom sind beschrieben. Zuerst wurde die Plastidentransformation in Grünalgen beschrieben (Boynton JE et al. (1988) Science 240: 1534-1538; Blowers AD et al. (1989) Plant Cell 1:123-132), später in höheren Pflanzen wie Tabak (Svab Z et al. (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87:8526-8530).

- EP-A 0 251 654, US 5,932,479, US 5,451,513, US 5,877,402, WO 01/64024, WO 00/20611, WO 01/42441, WO 99/10513, WO 97/32977, 10 WO 00/28014, WO 00/39313 beschreiben Methoden und DNA-Konstrukte zur Transformation von Plastiden höherer Pflanzen, wobei die zu transformierende DNA über homologe Rekombination ("Doppel-Crossover") in das Plastom (Plastidengenom) eingebaut wird. Im allgemeinen werden auf jeder Seite der zu insertierenden Sequenz 15 homologe Regionen von 1000 bp oder mehr genutzt. Dies führt sehr schnell zu großen Vektoren, deren Handhabung wenig komfortabel ist. Darüber hinaus sinkt die Effizienz der Transformation. Mit zunehmender Länge der zu integrierenden Fremd-DNA sinkt die Effizienz der homologen Rekombination. Ein weiterer Nachteil 20 ist die Tatsache, dass für jede Pflanzenart ein homologer Bereich identifiziert werden muss, der für den Prozess der DNA Integration mittels Doppel-Crossover genutzt werden kann. WO 99/10513 beansprucht, eine intergenische DNA Sequenz identifiziert zu haben, die ausreichend homolog zwischen den Genomen der Chloroplasten vieler höherer Pflanzen sei und so als universelle 25 Zielsequenz fungieren kann. Dass dieser Vektor bei anderen Arten als Tabak erfolgreich genutzt werden kann, wurde indies nicht nachgewiesen. Im Gegenteil: In WO 01/64024 passt derselbe Erfinder den Transformationsvektor an Nicht-Tabak Pflanzenarten 30 an, indem er aus diesen isolierte homologe DNA-Sequenzen verwendet. Da bei allen der oben beschriebenen Verfahren nur wenige Rekombinationsereignisse resultieren, ist eine Selektion der rekombinanten plastidären DNA-Moleküle erforderlich.
- 35 Die Plastiden-DNA höherer Pflanzen liegt in bis zu mehreren tausend Kopien pro Zelle vor. Um eine stabile Integration der Fremd-DNA zu erreichen, müssen alle Kopien der Plastiden-DNA gleichermaßen verändert werden. Im Fall der Plastidentransformation spricht man davon, den homotransplastomen Zustand 40 erreicht zu haben. Diesen Zustand erreicht man durch einen sogenannten "segregation and sorting" Prozess, indem man die Pflanzen unter ständigen Selektionsdruck hält. Durch den anhaltenden Selektionsdruck werden während der Zell- und Plastidenteilung solche Plastiden angereichert, in denen bereits viele 45 Kopien der plastidären DNA verändert wurden. Der Selektionsdruck wird aufrecht gehalten, bis der homotransplastome Zustand erreicht ist (Guda C et al. (2000) Plant Cell Reports

19:257-262). Es ist eine große Herausforderung, alle Kopien des Plastidengenoms zu verändern, um homotransplastome Pflanzen zu erhalten, die auch über Generationen ohne Zugabe eines Selektionsmittels das Fremdgen stabil in ihr plastidäres Genom eingebaut haben (Bogorad L (2000) TIBTECH 18:257-263). Zusätzlich zu dem ständigen Selektionsdruck wird gegebenenfalls durch wiederholte Regeneration bereits transformierten Gewebes das Erreichen des homotransplastomen Zustand sichergestellt (Svab Z und Maliga P (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90:913-917). Dies jedoch schränkt das Pflanzenmaterial, welches für die Plastidentransformation zur Verfügung steht, ein. Es wird daher vorgeschlagen, das Transgen ggf. mit einem anderen Gen, welches essentiell für das Überleben der Pflanze ist, zu koppeln. Gewebekultur-Techniken und Selektionsprozesse sind meist nicht universell auf alle Pflanzenarten anwendbar und stellen eine wesentliche Limitierung der Plastidentransformation dar, die insbesondere die Übertragbarkeit der Methode auf andere Arten als Tabak betrifft (Kota M et al. (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96:1840-1845). Eine kürzlich veröffentlichte Transformation von Plastiden von Tomate basiert auf Modifikationen im Regenerations- und Selektionsschema (Ruf S et al. (2001) Nature Biotech 19:870-875), die jedoch kosten- und zeitintensiv sind. Ein anderer Ansatz zielt darauf ab, die Anzahl der Plastiden pro Zelle und der DNA Moleküle pro Plastid zu reduzieren, um so weniger DNA Moleküle modifizieren zu müssen (Bogorad L (2000) TIBTECH 18:257-263). Insgesamt sind die Selektions- und Segregationsprozesse sehr zeitaufwendig.

WO 99/10513 beschreibt ein Verfahren bei dem auf dem zu transformierenden Plasmid ein plastidärer ORI (origin of replication, Replikationsursprung) lokalisiert wird, um so die Anzahl der für die Integration in das Plastidengenom zur Verfügung stehenden Kopien des zu transformierenden Vektors zu erhöhen (Guda C et al. (2000) Plant Cell Reports 19:257-262).

Die Notwendigkeit die Technik der Plastidentransformation zu verbessern wird auch bei Heifetz und Tuttle erwähnt (Heifetz P und Tuttle AM (2001) Curr Opin Plant Biol 4:157-161). WO 00/32799 lehrt, die Effizienz der Plastidentransformation durch den Einsatz von Pflanzen mit vergrößerten Plastiden zu erhöhen. Dadurch ergibt sich eine große Oberfläche der Plastiden, durch die die zu transformierende DNA leichter in die Plastiden eindringen kann. Der Mechanismus der DNA Integration erfolgt aber auch hier mittels konventioneller homologer Rekombination wie bei den oben beschriebenen Verfahren.

Verschiedene weitere Verfahren zur sequenzspezifischen Integration von DNA - insbesondere in die nukleäre DNA - sind beschrieben. Beschrieben ist ein Verfahren basierend auf selbst-spleißenden Introns der Gruppe II. Selbstspeißende Introns der Gruppe II können sequenzspezifisch - beispielsweise in intronlose Gene - insertieren. Die sequenzspezifische Hydrolyse der Ziel-DNA wird von einem RNA-Protein (Ribonukleoprotein) Komplex katalysiert. Die Sequenzspezifität der Endonuklease-Funktion wird dabei vor allem durch Ausbilden von Basenpaarungen zwischen dem RNA-Anteil des Ribonukleoprotein-Komplexes und der Ziel-DNA bestimmt. Die Verwendung von Introns der Gruppe II als Vektoren für Fremd-DNA wurde diskutiert. Durch Modifikation bestimmter Sequenzen eines Gruppe II Introns konnte dessen Ziel-Spezifität verändert werden. Auch konnten weitere Sequenzen in Gruppe II Introns insertiert werden, ohne deren Funktionen zu zerstören (Yang J. et al. (1996) Nature 381:332-335; Eickbush TH (1999) Curr Biol 9:R11-R14; Matsuura M et al. (1997) Genes Develop 11:2910-2924; Cousineau B et al. (1998) Cell 94: 451-462). Die Anpassung an bestimmte Zielsequenzen und die Ermittlung der damit verbundenen Regeln ist jedoch aufwendig und wurde bislang im Detail nur für das Ll.ltrB Intron entschlüsselt (Mohr G et al. (2000) Genes Develop 14:559-573). Zudem war die Effizienz des Retrohomings durch die Modifikation signifikant reduziert und nicht jedes der getesteten modifizierten Introns insertierte in die gewünschte Ziel-DNA. Nachteil der Technik ist, dass einige Positionen in der Nukleotid-Sequenz festgelegt sind, was die Auswahl der Ziel-Region in der zu transformierenden DNA einschränkt (Guo H et al. (1997) EMBO J 16:6835-6848). Außerdem scheint die Effizienz des Retrohomings-Prozesses gegenüber dem der Wildtyp-Introns vermindert. Die Effizienz der Introninsertion an verschiedenen Stellen an den betrachteten Genen war verschieden hoch. Ziel der Arbeiten war die Bereitstellung einer verbesserten Methode zur gezielten Insertion von DNA in die nukleäre DNA von Organismen, die keine effiziente homologe Rekombination erlauben (Guo et al. (2000) Science 289:452-456). Die beschriebenen Versuche sind extrachromosomal sowohl in dem Prokaryonten E.coli als auch in humanen Zellen realisiert worden. Die Übertragbarkeit auf die chromosomale DNA höherer Organismen oder die Anwendbarkeit auf plastidäre DNA wurde weder beschrieben noch gezeigt. Es wurde lediglich vorgeschlagen, zu versuchen, dieses System derart zu optimieren, dass eine Insertion in chromosomale DNA höherer Eukaryoten erfolgen kann. Dieses System soll eine alternative Methode in höheren Eukaryoten darstellen, die keine effiziente homologe Rekombination zeigen (Guo et al. (2000) Science 289:452-456). Dies gilt nicht für Plastiden höherer Pflanzen, bei denen die homologe Rekombination - zumindest bei einzelnen

plastidären DNA-Molekülen - in der Regel unproblematisch realisiert werden kann.

Neben Tabak wurde die Plastidentransformation in Kartoffel
5 (Sidorov VA et al. (1999) Plant J 19:209-216; WO 00/28014),
Petunie (WO 00/28014), Reis (Khan MS und Maliga P (1999) Nature
Biotech 17:910-915; WO 00/07431; US 6,153,813), Arabidopsis
(Sikdar SR et al. (1998) Plant Cell Reports 18: 20-24;
WO 97/32977) und Raps (WO 00/39313) gezeigt (Übersichtsartikel:
10 Bogorad L (2000) TIBTECH 18:257-263). Kürzlich wurden auch
transplastome Tomatenpflanzen beschrieben (Ruf S et al. (2001)
Nature Biotech 19:870-875).

Die Erzeugung sequenzspezifischer Doppelstrangbrüche mit Hilfe
15 von Restriktionsenzymen in eukaryontischen Genomen u.a. Pflanzen
ist beschrieben (Puchta H (1999) Methods Mol Biol 113:447-451).

WO 96/14408 beschreibt die Homing-Restriktionsendonuklease I-SceI
sowie verschiedene Möglichkeiten deren Verwendung. Eine Anwendung
20 zur Insertion von DNA-Sequenzen in plastidäre DNA ist nicht
beschrieben.

Posfai et al. beschreiben ein Verfahren zum Austausch von Genen
in dem Prokaryoten E.coli (Posfai G et al. (1999) Nucleic Acids
25 Res 27(22):4409-4415). Dabei kommt es im E.coli Genom zu einer
intramolekularen Rekombination zwischen dem endogenen und dem
mutierten Gen, die durch einen Schnitt mit dem Restriktionsenzym
I-SceI induziert wird. Rekombinationen in E.coli verlaufen deut-
lich effizienter und nach vermutlich anderen Mechanismen als im
30 Kern höherer Eukaryonten (zum Beispiel beschrieben bei Kuzminov A
(1999) Microbiol Mol Biol Rev. 63(4):751-813).

"Homing" meint das Phänomen, dass in einem Kompartiment zwei oder
mehr Kopien einer DNA-Sequenz existieren, wobei wenigstens eine
35 dieser beiden Sequenzen durch eine weitere DNA-Sequenz unter-
brochen ist, und in Folge eine Kopie der unterbrechenden DNA-
Sequenz auch in die nicht unterbrochene DNA-Sequenz eingebracht
wird. Meist tritt das Phänomen als Intron-Homing auf. Hier
existieren zwei oder mehr Allele eines Gens in einem Komparti-
40 ment, wobei wenigstens eines dieser Allele kein Intron besitzt.
In Folge wird eine Kopie des Introns auch in das intronlose Allel
eingebracht.

Introns in plastidären Genen höherer Pflanzen sind beschrieben
45 (Vogel J et al. (1999) Nucl Acids Res 27:3866-3874; Jenkins BD
et al. (1997) Plant Cell 9:283-296; Xu MQ et al. (1990) Science
250: 1566-1570). Das Spleißing eines arteigenen, nicht modi-

fizierten Introns mit den natürlichen Exonbereichen an einem ektopischen Locus im Plastidengenom ist ebenfalls beschrieben (Bock R und Maliga P (1995) Nucl Acids Res 23(13):2544-2547). Es gibt bisher keine Versuche, artfremde Introns, die darüber hinaus derart modifiziert sind, dass sie zusätzliche genetische Information besitzen und/oder in einer nicht natürlichen Sequenzumgebung spleißen, in Plastiden höherer Pflanzen einzubringen.

Versuche von Eddy und Gold zum "Homing"-Prozess in *E.coli* zeigten, dass bestimmte Rekombinationssysteme erforderlich sind. Die Art des Rekombinationssystems des Wirtes ist eine Schlüsselvariable (Eddy SR und Gold L (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:1544-1547). Es konnte daher nicht davon ausgegangen werden, dass der natürlich vorkommende Prozess des "Homings" beliebig von einem in einen anderen Organismus übertragen werden kann, zumal wenn dieser Prozess in diesem Organismus natürlicherweise mutmaßlich nicht vorkommt.

Dürrenberger et al. beschreiben die Induktion einer intrachromosomalen Rekombination in Chloroplasten der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* unter Verwendung der I-CreI Homing-Endonuklease (Dürrenberger F et al. (1996) Nucleic Acid Res 24(17):3323-3331). Die Rekombination erfolgt zwischen dem endogenen 23S-Gen und einer ins Chromosom eines I-CreI Deletionsstammes insertierten 23S-cDNA, die eine I-CreI Schnittstelle enthält. Doppelstrangbrüche werden durch "Mating" des entsprechenden transgenen Organismus mit einem I-CreI natürlicherweise exprimierenden Organismus induziert. Zum Zeitpunkt des Doppelstrangbruches ist die Fremd-DNA bereits in die chromosomale DNA insertiert und die Rekombination erfolgt intramolekular und nicht zwischen zwei separaten Molekülen.

Kürzlich wurde gezeigt, dass ein in *Chlamydomonas reinhardtii* natürlich vorkommendes, mobiles Intron, welches auch eine Homing Endonuklease kodiert, effizient in eine intronlose Kopie transformiert werden kann (Odom OW et al. (2001) Mol Cell Biol 21: 3472-3481). Die Steigerung der Transformationsrate war dabei von der Anwesenheit der Homing-Endonuklease abhängig. In der Diskussion wird allgemein und ohne konkrete Ausführungshinweise vorgeschlagen, die Plastidentransformation dadurch zu verbessern, dass Doppelstrangbrüche induziert werden. Dazu sollen zunächst die Erkennungsregionen selten schneidender Nukleasen in einem ersten Schritt eingebracht werden, und das nachfolgende Integrationsereignis dann an dem selben Locus stattfinden. Genauere Hinweise, wie die Erkennungsregionen einzubringen sind, welche Nukleasen und Erkennungsregionen verwendet werden können, wie der erste und der zweite Schritt konkret gestaltet werden etc. werden

nicht gegeben. Bisher wurde lediglich gezeigt, dass in Plastiden der Alge *Chlamydomonas* das Einbringen eines arteigenen Introns mittels der natürlicherweise mit der Mobilität des Intron verbundenen Homing Endonuklease funktionierte. Zudem wurden die
5 Ergebnisse in einer Algenart generiert. Die oben erwähnten Versuche von Eddy und Gold mit *E. coli*, bei denen wie in Plastiden höherer Pflanzen keine mobilen Introns der Gruppe I bekannt sind, zeigen, dass eine Übertragbarkeit auf heterologe Systeme nicht ohne weiteres möglich ist. Die Übertragbarkeit der Beobachtungen
10 von der Alge *Chlamydomonas* auf höhere Pflanzen ist für den Fachmann daher keinesfalls naheliegend. Im Gegenteil gibt es zahlreiche Hinweise, die die Übertragbarkeit eher in Frage stellen:

1. Homing-Systeme sind nicht einfach von einem auf das andere
15 System übertragbar (Eddy SR und Gold L (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:1544-1547). Die Übertragbarkeit auf höhere Pflanzen ist um so mehr fraglich, da in den bereits sequenzierten Plastidengenomen höherer Pflanzen (http://mega-sun.bch.umontreal.ca/ogmp/projects/other/cp_list.html)
20 keine Homing Endonukleasen indentifiziert wurden. Es ist daher davon auszugehen, dass die im Plastidengenom höherer Pflanzen gefundenen Introns nicht mobil sind und dort natürlicherweise kein Homing-Mechanismus besteht.
- 25 2. *Chlamydomonas* hat nur jeweils ein Plastid, während in den Zellen höherer Pflanzen bis zu 100 Plastiden pro Zelle vorliegen.
3. Die konventionelle Plastidentransformation ist in *Chlamydo-*
30 *monas* um Größenordnungen effizienter als in höheren Pflanzen, was darauf hindeutet, dass diese beiden Systeme nicht direkt miteinander vergleichbar sind. Hinsichtlich der Regeneration von transplastomen Algen bzw. transplastomen Pflanzen könnte auch eine entscheidende Rolle spielen, dass die Teilung der
35 Plastiden der Algen mit dem Zellzyklus synchronisiert ist, während dies nicht für die Plastiden der höheren Pflanzen gilt (Sato N (2001) Trends Plant Science 6:151-155).
4. Die Mechanismen der DNA Integration in Plastiden von
40 *Chlamydomonas* und höheren Pflanzen scheinen grundlegend verschieden zu sein. So wurde gefunden, dass die zwischenartliche Plastidentransformation (nutzen von homologen Bereichen anstelle von identischen Sequenzen) in *Chlamydo-*
45 *monas* zu einer deutlichen Reduktion der Transformations-effizienz führt, was in Tabak aber nicht beobachtet werden kann. Ähnliches gilt auch für den Abstand eines molekularen Markers auf der homologen DNA zur heterologen Sequenz auf dem

- Transformationsplasmid: Je näher der molekulare Marker am Rand der Zielregion für die Integration mittels Doppel-Crossover liegt, desto seltener wird er bei der Transformation in Plastiden von *Chlamydomonas* übertragen. In Tabak wurden multiple Rekombinationsmechanismen beobachtet, wobei aber auch molekulare Marker nahe am Rand der homologen Bereiche effektiv bei der Transformation in das Plastidengenom übertragen wurden (Kavanagh TA et al. (1999) Genetics 152: 1111-1122 und Referenzen darin).
- 5
- 10
5. In *Chlamydomonas* verschmelzen die Plastiden der beiden Eltern während einer Kreuzung, auch bei einer zwischenartlichen Kreuzung. Die Plastidenfusion ist bei *Chlamydomonas* ein natürlicher Prozess und auch die DNA der Plastiden wird gemischt und neu rekombiniert. Daher machen mobile Introns in den Organellen dieser Organismen Sinn. Im Gegensatz dazu werden die Plastiden bei den meisten höheren Pflanzen uniparental vererbt, so dass es weder zu einem Mischen der plastidären DNA kommt, noch Rekombinationen zwischen der plastidären DNA der Mutter und des Vaters auftreten können. Selbst in den Pflanzenarten, in denen es zu biparentaler Vererbung der Plastiden kommt, konnte keine Fusion der Plastiden beobachtet werden. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass eine natürliche Plastidenfusion in höheren Pflanzen ausgeschlossen ist (Hagemann R. (1992) Plastid genetics in higher plants; in Cell Organelles, Herausgeber: Herrmann RG, Springer Verlag, Wien, S.65-96) und das Mechanismen wie das Intron-Homing nicht entwickelt sind oder sogar unterdrückt werden.
- 15
- 20
- 25
- 30
- Die Erhöhung der Effizienz der homologen Rekombination innerhalb der Kern-DNA mit Hilfe von selten schneidenden Endonukleasen wurde bei verschiedenen Organismen beschrieben (Puchta H et al. (1993) Nucleic Acids Research. 21(22):5034-40; Puchta H et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93:5055-5060; Rong YS und Golic KG (2000) Science 28:2013-2018; Jasin M (1996) Trends Genet 12: 224-229). Im Unterschied zu Plastiden ist die Insertion mittels homologer Rekombination in die Kern-DNA problematisch und erfolgt meist mittels zufälliger illegitimen Integration. Dies zeigt,
- 35
- 40
- dass im Kern-Genom etablierte Techniken nicht unbedingt auf die Plastiden übertragen werden können. Bei Plastiden höherer Pflanzen findet im Gegensatz zu der Situation im Kern nahezu ausschließlich und mit hoher Effizienz eine Integration über homologe Rekombination statt (Bock R und Hagemann R (2000) Progress in Botany 61:76-90; Maliga P et al. (1994) Homologous recombination and integration of foreign DNA in plastids of higher
- 45

plants. In Homologous recombination and gene silencing in plants. Paszkowski J, ed. (Kluwer Academic publishers), S.83-93).

Die Effizienz der homologen Rekombination zur DNA-Integration
5 in das Plastom wurde allgemein nicht als limitierender Faktor
angesehen und - im Gegenteil - als unkritisch eingestuft. Die
aktuelle Forschung zur Optimierung der Plastidentransformation
richtet sich demzufolge nicht auf eine Optimierung der homologen
Rekombination, sondern zum Beispiel auf verbesserte Selektions-
10 marker, verbesserte Selektions- und Regenerationstechniken etc.
Nichtsdestotrotz sind bislang keine wesentlichen Durchbrüche
erzielt worden.

Wie die oben beschriebenen Verfahren und Probleme bei der
15 Plastidentransformation deutlich hervorheben, ist die Bereit-
stellung neuer Verfahren zur Herstellung homotransplastomer
Pflanzen ein lange bestehendes ungelöstes Bedürfnis der Pflanzen-
biotechnologie. Ein weiteres Bedürfnis ist die Vermeidung von
Antibiotika- oder Herbizidselektionsmarkern aus Gründen der
20 Zulassung und Verbraucherakzeptanz. Für die Plastidentrans-
formation ist bisher noch kein Verfahren beschrieben, dass ohne
einen solchen Selektionsmarker auskommt.

Es ergab sich daher die Aufgabe, neue Verfahren zu entwickeln,
25 die eine effiziente Integration von Fremd-DNA in alle Kopien der
Plastiden-DNA sicher stellt und eine effiziente Selektion ent-
sprechender homotransplastomer Pflanzen ermöglicht. Diese Aufgabe
wurde durch Bereitstellung des erfindungsgemäßen Integrations-/
Selektionsverfahrens in überraschender Weise gelöst.

30 Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren
zur Integration einer DNA-Sequenz in die plastidäre DNA einer
mehrzelligen Pflanze oder von dieser abgeleiteten Zelle und zur
Selektion überwiegend homotransplastomer Zellen oder Pflanzen,
35 dadurch gekennzeichnet, dass

- a) die plastidären DNA-Moleküle besagter mehrzelliger
Pflanze oder von dieser abgeleiteten Zelle mindestens
eine Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-
40 Doppelstrangbrüchen enthalten und
- b) mindestens ein Enzym geeignet zur Induktion von DNA-
Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur gezielten
Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen sowie mindestens ein
45 Transformationskonstrukt umfassend eine Insertionssequenz
in mindestens einem Plastid besagter mehrzelligen Pflanze

oder von dieser abgeleiteten Zelle zusammengebracht werden,
und

- 5 c) die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an den Erkennungs-
sequenzen zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen
erfolgt, und
- 10 d) die Insertionssequenz in die plastidäre DNA insertiert,
wobei die Funktionalität der Erkennungssequenz zur gezielten
Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen deaktiviert wird,
so dass besagte Erkennungssequenz nicht mehr durch das
Enzym geeignet zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen
geschnitten werden kann, und
- 15 e) Pflanzen oder Zellen isoliert werden, bei denen die Inser-
tionssequenz in die plastidären DNA-Moleküle insertiert
wurde.

Das System ermöglicht überraschenderweise eine erhebliche
20 Steigerung der Effizienz bei der Herstellung überwiegend
homotransplastomer Pflanzen. Dabei wird sowohl die Effizienz
der Insertion in die plastidäre DNA als auch die Effizienz
des Selektionsprozess überwiegend homotransplastomer Pflanzen
gesteigert.

- 25 Durch die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens ergibt
sich ein Selektionsdruck, die Insertionssequenz in alle Kopien
der plastidären DNA einzubauen. Im Idealfall erfolgt die Ver-
breitung der Insertionssequenz unabhängig von Selektionsmarkern
30 wie Herbizid- oder Antibiotikaresistenzen. Dies hat deutliche
Vorteile bezüglich Zulassung- und/oder Verbraucherakzeptanz. Die
Verwendung solcher Selektionsmarker kann jedoch die Effizienz
weiter steigern. Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung
homoplastomer Pflanzen ist den im Stand der Technik beschriebenen
35 deutlich überlegen, da es einen schnelleren, effizienteren und
damit kostengünstigeren Weg zu homotransplastomen Pflanzen
bietet. Ferner hat das System den Vorteil, dass die zur Trans-
formation genutzten Konstrukte klein gehalten werden können, da
im Vergleich zur Integration mittels des Doppel-Crossovers die
40 homologen Bereiche im Plastidentransformations-Vektor kleiner
sein bzw. gänzlich fehlen können.

11

Gegenüber der Transformation des Zellkerns hat die Transformation von Plastiden zahlreiche Vorteile. Unter anderem sind zu nennen:

- 5 a) Während die homologe Rekombination in die nukleäre DNA nur schwer zu realisieren ist, kann in Plastiden DNA leicht an einem vordefinierten Ort mittels Doppel-Crossover, einer Form der homologer Rekombination, integriert werden. Positionseffekte oder "Genesilencing", die man bei Kerntransformationen aufgrund der illegitimen Integration an einen nicht vordefinierten Locus findet, werden so vermieden.
- 10 b) Es können sehr hohe Expressionslevel erreicht werden, vermutlich aufgrund der hohen Kopiezahl der plastidären DNA.
- 15 c) Die DNA der Plastiden wird bei höheren Pflanzen in der Regel nur maternal vererbt, so dass die eingebrachte Fremd-DNA nicht über Pollen verbreitet und ein Auskreuzen somit effektiv unterbunden werden kann.
- 20 d) Die prokaryotische Natur der Plastiden ermöglicht die Expression von Genen im Rahmen einer polycistronischen Operonstruktur. Daher ist es nicht notwendig, jedes zu exprimierende Gen mit einem eigenen Promotor etc. auszurüsten. Dies erleichtert das Einbringen vieler Gene
- 25 auf einmal, etwa um ganze Biosynthesewege in die Plastiden einzubringen.

"Plastid" meint die Proplastiden sowie alle daraus hervorgehenden Organellen wie beispielsweise Chloroplasten, Etioplasten, Chromoplasten, Amyloplasten, Leukoplasten, Dermaplasten und Elaioplasten (Heifetz P (2000) Biochimie 82:655-666).

"Plastom" meint das Genom, also die Gesamtheit der genetischen Information, eines Plastids.

35 "Homotransplastom" meint einen transplastomen und homoplastomen Zustand.

"Transplastom" meint in Bezug auf beispielsweise eine Pflanze, Zelle, Gewebe, Plastid oder plastidäre-DNA alle solche durch gentechnische Methoden zustande gekommene Formen der vorgenannten, die eine plastidäre DNA umfassen, die durch gentechnische Methoden modifiziert wurde, wobei die Modifikation beispielhaft Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder

45 Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste umfassen kann.

12.

"Heteroplastom" meint das Vorliegen einer gemischten Population verschiedener plastidärer DNAs innerhalb eines einzelnen Plastides oder innerhalb einer Population von Plastiden innerhalb einer pflanzlichen Zelle oder Gewebe.

5

"Homoplastom" meint eine einheitliche Population von plastidärer DNA innerhalb eines einzelnen Plastides oder innerhalb einer Population von Plastiden innerhalb einer pflanzlichen Zelle oder Gewebe. Homoplastome Zellen, Gewebe oder Pflanzen sind genetisch stabil, da sie nur eine Art plastidärer DNA umfassen d.h. sie bleiben im allgemeinen homoplastom auch wenn der Selektionsdruck nicht mehr anhält. Durch Selbstung erhaltene Nachkommen sind ebenfalls homoplastom.

- 15 Im Rahmen dieser Erfindung meint "überwiegend homoplastom" oder "überwiegend homotransplastom" all solche Pflanzen oder Zellen, bei denen der Anteil der erwünschten plastidären hinsichtlich eines Merkmals veränderten DNA-Moleküle - beispielsweise mit der Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen oder der insertierten Insertionssequenz - mindestens 50 %, bevorzugt mindestens 70 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 %, am meisten bevorzugt mindestens 95 % von der Gesamtheit aller plastidären DNA-Moleküle in einer Pflanze oder einem Gewebe, Zelle bzw. Plastid derselben beträgt. Überwiegend homoplastome oder überwiegend homotransplastome Pflanzen können durch weiteres Aufrechterhalten des Selektionsdruckes und gegebenenfalls wiederholenden Regenerationen in homoplastome oder homotransplastome Pflanzen umgewandelt werden. Aufgrund des "Homing"-Prozesses ist jedoch ein andauernder Selektionsdruck nicht zwingend erforderlich. In einer besonderen Ausführungsform ist daher eine überwiegend homoplastome bzw. homotransplastome Pflanze rein homoplastom bzw. homotransplastom. Eine Pflanze, die bezüglich einer DSB-Erkennungssequenz überwiegend homoplastom bzw. homotransplastom oder rein homoplastom bzw. homotransplastom ist, wird infolge als "Masterpflanze" bezeichnet. Der Anteil der erwünschten plastidären hinsichtlich eines Merkmals veränderten DNA-Moleküle kann beispielsweise mittels Southern Analyse - wie beispielhaft in Beispiel 4 beschrieben - in der dem Fachmann bekannten Weise ermittelt werden. Das Verhältnis zwischen den plastidären Ausgangs-DNA Molekülen und den hinsichtlich eines Merkmals veränderten plastidären DNA-Molekülen lässt sich durch Vergleich der Intensität der jeweiligen Banden bestimmen.

- "Mehrzellige Pflanze oder von dieser abgeleiteten Zelle" meint allgemein jede Zellen, Gewebe, Teile oder Vermehrungsgut (wie Samen oder Früchte) einer Pflanze, die in ihrem adulten Zustand einen mehrzelligen Organismus darstellt oder darstellen kann.

13

- Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle Gattungen und Arten höherer und niedrigerer Pflanzen des Pflanzenreiches. Einjährige, mehrjährige, monocotyledone und dicotyledone Pflanzen sind bevorzugt. Eingeschlossen sind reife Pflanzen, Saatgut, 5 Sprosse und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut (zum Beispiel Knollen, Samen oder Früchte) und Kulturen, zum Beispiel Zell- oder Kalluskulturen. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem 10 frühen Entwicklungsstadium.

- Bevorzugt sind Pflanzen nachfolgender Pflanzenfamilien: Amarantaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Carophyllaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Labiatae, Leguminosae, 15 Papilionoideae, Liliaceae, Linaceae, Malvaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Sterculiaceae, Tetragoniaceae, Theaceae, Umbelliferae.

- Bevorzugte monokotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus 20 den monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel der Familie der Gramineae wie Reis, Mais, Weizen oder andere Getreidearten wie Gerste, Hirse, Roggen, Triticale oder Hafer sowie dem Zuckerrohr sowie alle Arten von Gräsern.

- 25 Bevorzugte dikotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den dikotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel

- Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes oder Calendula und andere mehr, 30
- Compositae, besonders die Gattung Lactuca, ganz besonders die Art sativa (Salat) und andere mehr,
- Cruciferae, besonders die Gattung Brassica, ganz besonders 35 die Arten napus (Raps), campestris (Rübe), oleracea cv Tastie (Kohl), oleracea cv Snowball Y (Blumenkohl) und oleracea cv Emperor (Broccoli) und weitere Kohlarten; und der Gattung Arabidopsis, ganz besonders die Art thaliana sowie Kresse oder Canola und andere mehr, 40
- Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini und andere mehr,
- Leguminosae besonders die Gattung Glycine, ganz besonders die Art max (Sojabohne) Soja sowie Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen 45 oder Erdnuss und andere mehr

- Rubiaceae, bevorzugt der Unterklasse Lamiidae wie beispielsweise *Coffea arabica* oder *Coffea liberica* (Kaffestrauch) und andere mehr,
 - 5 - Solanaceae besonders die Gattung *Lycopersicon*, ganz besonders die Art *esculentum* (Tomate) und die Gattung *Solanum*, ganz besonders die Art *tuberosum* (Kartoffel) und *melongena* (Aubergine) sowie Tabak oder Paprika und andere mehr,
 - 10 - Sterculiaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise *Theobroma cacao* (Kakaostrauch) und andere mehr,
 - Theaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise *Camellia sinensis* oder *Thea sinensis* (Teestrauch) und
 - 15 andere mehr,
 - Umbelliferae, besonders die Gattung *Daucus* (ganz besonders die Art *carota* (Karotte)) und *Apium* (ganz besonders die Art *graveolens dulce* (Selderie)) und andere mehr; und die Gattung
 - 20 *Capsicum*, ganz besonders die Art *annum* (Pfeffer) und andere mehr,
- sowie Lein, Soja, Baumwolle, Hanf, Flachs, Gurke, Spinat, Möhre, Zuckerrübe und den verschiedenen Baum-, Nuss- und Weinarten,
- 25 insbesondere Banane und Kiwi.
- Umfasst sind ferner Schmuckpflanzen, Nutz- oder Zierbäume, Blumen, Schnittblumen, Sträucher oder Rasen. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen Angiospermen, Bryophyten
- 30 wie zum Beispiel Hepaticae (Leberblümchen) und Musci (Moose); Pteridophyten wie Farne, Schachtelhalm und Lycopoden; Gymnospermen wie Koniferen, Cycaden, Ginkgo und Gnetalen, die Familien der Rosaceae wie Rose, Ericaceae wie Rhododendrons und Azaleen, Euphorbiaceae wie Weihnachtssterne und Kroton, Caryophyllaceae
- 35 wie Nelken, Solanaceae wie Petunien, Gesneriaceae wie das Usambaraveilchen, Balsaminaceae wie das Springkraut, Orchidaceae wie Orchideen, Iridaceae wie Gladiolen, Iris, Freesie und Krokus, Compositae wie Ringelblume, Geraniaceae wie Geranien, Liliaceae wie der Drachenbaum, Moraceae wie Ficus, Araceae wie Philodendron
- 40 und andere mehr.
- Am meisten bevorzugt sind *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Tagetes* und *Brassica napus* sowie alle Gattungen und Arten, die als Nahrungs- oder Futtermittel zum Einsatz kommen,
- 45 wie die beschriebenen Getreidearten, oder sich zur Herstellung von Ölen eignen, wie Ölsaaten, Nussarten, Soja, Sonnenblume, Kürbis und Erdnuss.

"Enzym geeignet zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen" (infolge "DSBI-Enzym" für "double strand-break inducing enzyme") meint allgemein all solche Enzyme, die in der Lage sind, 5 sequenzspezifisch Doppelstrangbrüche in doppelsträngige DNA zu erzeugen. Beispielsweise aber nicht einschränkend sind zu nennen:

1. Restriktionsendonukleasen, bevorzugt Typ II Restriktions-
10 endonukleasen, besonders bevorzugt Homing-Endonukleasen wie weiter unten im Detail beschrieben.
2. Künstliche Nukleasen wie weiter unten im Detail beschrieben, wie beispielsweise chimere Nukleasen, mutierte Restriktions-
15 oder Homing-Endonukleasen oder RNA-Proteinpartikel abgeleitet von mobilen Introns der Gruppe II.

Sowohl natürliche als auch künstlich hergestellte DSBI-Enzyme sind geeignet. Bevorzugt sind all solche DSBI-Enzyme, deren
20 Erkennungssequenz bekannt ist und die entweder in Form ihrer Proteine (beispielsweise durch Aufreinigung) gewonnen oder unter Verwendung ihrer Nukleinsäuresequenz exprimiert werden können.

Bevorzugt wird das DSBI-Enzym unter Kenntnis seiner spezifischen
25 Erkennungssequenz so ausgewählt, dass es zusätzlich zu der Ziel-Erkennungssequenz keine weitere funktionellen Erkennungsregionen im Plastidengenom besitzt. Ganz besonders bevorzugt sind deshalb Homing-Endonukleasen (Übersicht: Belfort M und Roberts RJ (1997) Nucleic Acids Res 25:3379-3388; Jasin M (1996)
30 Trends Genet 12:224-228; Internet: <http://rebase.neb.com/rebase/rebase.homing.html>; Roberts RJ and Macelis D (2001) Nucleic Acids Res 29: 268-269). Diese erfüllen aufgrund ihrer langen Erkennungssequenzen diese Anforderung. Aufgrund der geringen Größe des Plastoms ist es jedoch auch denkbar, dass DSBI-Enzyme
35 mit kürzeren Erkennungssequenzen (beispielsweise Restriktionsendonukleasen) mit Erfolg eingesetzt werden können.

Neben der oben beschriebenen bevorzugten Ausführungsform, bei der lediglich eine einzelne Erkennungssequenz für das DSBI-Enzym
40 in der plastidären DNA vorhanden ist, sind Fälle denkbar, bei denen auch weitere, funktionell gleiche Erkennungssequenzen vorteilhaft genutzt werden können. Dies ist insbesondere der Fall, wenn das Plastom duplizierte Gene (z.B. in Form von invertierten "Repeats") umfasst. Hier soll die Integration in alle Kopien
45 erfolgen, so dass auch ein Schnitt in allen Kopien wünschenswert ist.

16

Die für derartige Homing-Endonukleasen kodierenden Sequenzen ... können beispielsweise aus dem Chloroplastengenom von *Chlamydomonas* isoliert werden (Turmel M et al. (1993) J Mol Biol 232: 446-467). Sie sind klein (18 bis 26 kD), weisen in ihrem offenen 5 Leseraster (ORF) eine "coding usage" auf, die direkt für nukleäre oder plastidäre Expression höheren Pflanzen (Monnat RJ Jr et al. (1999) Biochem Biophys Res Com 255:88-93) geeignet ist.

- Weitere Homing-Endonukleasen sind unter der oben angegebenen Internet-Adresse aufgeführt, zu nennen sind beispielsweise Homing-Endonukleasen wie F-SceI, F-SceII, F-SuvI, F-TevI, F-TevII, I-AmaI, I-AniI, I-CeuI, I-CeuAIIP, I-ChuI, I-Cmoel, I-CpaI, I-CpaII, I-CreI, I-CrepsbIP, I-CrepsbIIP, I-CrepsbIIIP, I-CrepsbIVP, I-CsmI, I-CvuI, I-CvuAIP, I-DdiII, I-DirI, I-DmoI, 15 I-HspNIP, I-LlaI, I-MsoI, I-NaaI, I-NanI, I-NclIP, I-NgrIP, I-NitI, I-NjaI, I-Nsp236IP, I-PakI, I-PboIP, I-PcuIP, I-PcuAI, I-PcuVI, I-PgrIP, I-PobIP, I-PorI, I-PorIIP, I-PpbIP, I-PpoI, I-SPBetaIP, I-ScaI, I-SceI, I-SceII, I-SceIII, I-SceIV, I-SceV, I-SceVI, I-SceVII, I-SexIP, I-SneIP, I-SpomCP, I-SpomIP, 20 I-SpomIIP, I-SquIP, I-Ssp6803I, I-SthPhiJP, I-SthPhiST3P, I-SthPhiS3bP, I-TdeIP, I-TevI, I-TevII, I-TevIII, I-UarAP, I-UarHGPA1P, I-UarHGPA13P, I-VinIP, I-ZbiIP, PI-MtuI, PI-MtuHIP, PI-MtuHIIP, PI-PfuI, PI-PfuII, PI-PkoI, PI-PkoII, PI-PspI, PI-Rma43812IP, PI-SPBetaIP, PI-SceI, PI-TfuI, PI-TfuII, PI-ThyI, 25 PI-TliI, PI-TliII.

- Bevorzugt sind dabei die Homing-Endonukleasen, deren Gensequenzen bereits bekannt sind, wie beispielsweise F-SceI, I-CeuI, I-ChuI, I-DmoI, I-CpaI, I-CpaII, I-CreI, I-CsmI, F-TevI, F-TevII, I-TevI, 30 I-TevII, I-AniI, I-CvuI, I-LlaI, I-NanI, I-MsoI, I-NitI, I-NjaI, I-PakI, I-PorI, I-PpoI, I-ScaI, I-SceI, I-Ssp6803I, PI-PkoI, PI-PkoII, PI-PspI, PI-TfuI, PI-TliI.

- Besonders bevorzugt werden Homing-Endonuklease genutzt, die 35 so in der Natur, besonders bevorzugt natürlicherweise in Organellen vorkommen. Am meisten bevorzugt stammen die Homing-Endonukleasen aus Organismen, die bei ähnlichen Temperaturen leben wie Pflanzen. Hier sind von besonderem Interesse die aus Hefe und *Chlamydomonas* Spezies identifizierten Homing Endo- 40 nukleasen. Natürlich ist es auch denkbar, Homing Endonukleasen, die aus extremophilen Organismen isoliert wurden, zu nutzen, solange diese in den Plastiden der zu transformierenden Pflanze aktiv sind.

17.

Ganz besonders bevorzugt sind

- I-CeuI (Cote MJ und Turmel M (1995) Curr Genet 27:177-183.;
Gauthier A et al. (1991) Curr Genet 19:43-47; Marshall (1991)
5 Gene 104:241-245; GenBank Acc.-No.: Z17234 Nukleotide 5102
bis 5758),
- I-ChuI (Cote V et al. (1993) Gene 129:69-76; GenBank Acc.-No.:
106107, Nukleotide 419 bis 1075),
- 10 - I-CmoEI (Drouin M et al. (2000) Nucl Acids Res 28:
4566-4572),
- I-CpaI aus *Chlamydomonas pallidostigmatica* (GenBank Acc.-No.:
15 L36830, Nukleotide 357 bis 815; Turmel M et al. (1995)
Nucleic Acids Res 23:2519-2525; Turmel, M et al. (1995)
Mol Biol Evol 12:533-545; siehe auch SEQ ID NO: 13 bzw. 14)
- I-CpaII (Turmel M et al. (1995) Mol Biol Evol 12:533-545;
20 GenBank Acc.-No.: L39865, Nukleotide 719 bis 1423),
- I-CreI (Wang J et al. (1997) Nucleic Acids Res 25: 3767-3776;
Dürrenberger, F und Rochaix JD (1991) EMBO J 10:3495-3501;
GenBank Acc.-No.: X01977, Nukleotide 571 bis 1062),
- 25 - I-CsmI (Ma DP et al. (1992) Plant Mol Biol 18:1001-1004)
- I-NanI (Elde M et al. (1999) Eur J Biochem. 259:281-288;
GenBank Acc.-No.: X78280, Nukleotide 418 bis 1155),
- 30 - I-NitI (GenBank Acc.-No.: X78277, Nukleotide 426 bis 1163),
- I-NjaI (GenBank Acc.-No.: X78279, Nukleotide 416 bis 1153),
- 35 - I-PpoI kodiert auf der extrachromosomaler DNA im Kern von
Physarum polycephalum (Muscarella DE und Vogt VM (1989)
Cell 56:443-454; Lin J und Vogt VM (1998) Mol Cell Biol
18:5809-5817; GenBank Acc.-No.: M38131, Nukleotide 86 bis
577). Darüber hinaus kann auch die von einem alternativen
40 Startkodon ausgehende längere Sequenz, kodierend für I-PpoI
genutzt werden. Diese Sequenz umfaßt in der Sequenz gemäß
GenBank Acc.-No M38131 die Nukleotide 20 bis 577. Bevorzugt
wird die kürzere Sequenz genutzt; sie kann jedoch an jeder
Stelle durch die entsprechend längere ausgetauscht werden.
- 45 Besonders bevorzugt wird im Rahmen dieser Erfindung eine
künstliche Sequenz genutzt, die für die selben Aminosäuren
kodiert, wie die Sequenz der Nukleotide 86 bis 577 der Se-

quenz gemäß GenBank Acc.-No.: M38131 (siehe auch SEQ ID NO: 5, 11, 12, 70 oder 71),

- 5 - I-PspI (GenBank Acc.-No.: U00707, Nukleotide 1839 bis 3449),
- I-ScaI (Monteilhet C et al. (2000) Nucleic Acids Res 28: 1245-1251; GenBank Acc.-No.: X95974, Nukleotide 55 bis 465).
- I-SceI aus den Mitochondrien der Bäckerhefe (WO 96/14408; 10 US 5,962,327 dort Seq ID NO: 1),
- Endo SceI (Kawasaki et al. (1991) J Biol Chem 266:5342-5347, identisch zu F-SceI; GenBank Acc.-No.: M63839, Nukleotide 159 bis 1589),
- 15 - I-SceII (Sarguiel B et al. (1990) Nucleic Acids Res 18:5659-5665),
- I-SceIII (Sarguiel B et al. (1991) Mol Gen Genet. 255:340-341),
- 20 - I-Ssp6803I (GenBank Acc.-No.: D64003, Nukleotide 35372 bis 35824),
- I-TevI (Chu et al. (1990) Proc Natl Acad Sci USA 25 87:3574-3578; Bell-Pedersen et al. (1990) Nucleic Acids Res 18:3763-3770; GenBank Acc.-No.: AF158101, Nukleotide 144431 bis 143694),
- I-TevII (Bell-Pedersen et al. (1990) Nucleic Acids Res 30 18:3763-3770; GenBank Acc.-No.: AF158101, Nukleotide 45612 bis 44836),
- I-TevIII (Eddy et al. (1991) Genes Dev. 5:1032-1041),

35 Ganz besonders bevorzugt sind kommerziell erhältliche Homing-Endonukleasen wie I-CeuI, I-SceI, I-PpoI, PI-PspI oder PI-SceI. Am meisten bevorzugt sind I-SceI und I-PpoI. Während das Gen codierend für I-PpoI in der natürlichen Form genutzt werden kann, besitzt das Gen kodierend für I-SceI eine Editierstelle. Da die 40 entsprechende Editierung in den Plastiden höherer Pflanzen im Unterschied zu den Mitochondrien der Hefe nicht durchgeführt wird, muss eine künstliche das I-SceI Protein codierende Sequenz zur heterologen Expression dieses Enzyms eingesetzt werden (US 5,866,361).

- Neben den aufgeführten Homing-Endonukleasen gibt es weitere Intron-kodierte Enzyme, die an homologen Stellen der Genome verwandter Organismen zu finden sind. Diese Homing-Endonukleasen besitzen in der Regel eine ähnliche Sequenzspezifität und sind
- 5 daher ebenso gut als DSB1 Enzym für die Einführung eines DSB in das Plasmid an der DSB-Erkennungssequenz geeignet. So erkennen neben I-CreI die entsprechende Sequenz auch Sob2593c, Clu2593c, Col2593c, Ciy2593c, Hla2593c, Cag2593c, I-CvuI, I-PakI, Tmu2593c, Msp2593c, I-MsoI, Sdu2593c, Mvi2593m, Nol2593m oder Aca2593m.
- 10 Neben I-CeuI erkennen entsprechende Sequenz auch I-CecI, I-CmoI, I-CellI, I-CpaIII, I-CmuI, I-CluI, I-SobI oder I-AstI. Neben I-CpaI erkennen eine entsprechende Sequenz auch Cbr1931c, Cfr1931c, Cme1931c, Cge1931c, Pcr1931c, Msp1931c, Mso1931c, Ptu1931c, Cvu1931m, Msp1931m, Mso1931m, Nol1931m, Aca1931m oder
- 15 Snel1931b. Darüber hinaus gibt es Introns, die an der Position 1951 der 23S rDNA inseriert sind (Nummerierung bezieht sich auf homologen Position in der 23S rDNA von E. coli). Auch diese Introns kodieren für putative Homing-Endonukleasen, die als DSB1 Enzyme zum spezifischen Schneiden der plastidären DNA genutzt
- 20 werden können. Zu diesen gehören beispielsweise Cbr1951c, Msp1951c, Mso1951c, Cvu1951m oder Aca1951m (Lucas P et al. (2001) Nucl Acids Res 29:960-969).

- Am meisten bevorzugt sind die Homing-Endonukleasen gemäß den
- 25 Proteinsequenzen beschrieben durch SEQ ID NO: 5, 12 oder 14. Bei der Herstellung entsprechender Expressionskassetten werden demzufolge Nukleinsäuresequenzen eingesetzt, die für ein Protein gemäß SEQ ID NO: 5, 12 bzw. 14 kodieren, insbesondere bevorzugt ist dabei die Verwendung der Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID
- 30 NO: 11 bzw. 13 oder einer Expressionskassette gemäß SEQ ID NO: 4.

- Die Enzyme können in der dem Fachmann geläufigen Art und Weise aus ihren Herkunftsorganismen aufgereinigt und/oder die für sie kodierende Nukleinsäuresequenz kloniert werden. Die Sequenzen
- 35 verschiedener Enzyme sind in der GenBank hinterlegt (s.o.).

- Als künstliche DSB1-Enzyme seien beispielhaft chimäre Nukleasen zu nennen, die sich aus einer unspezifischen Nukleasedomäne und einer sequenzspezifischen DNA-Bindungsdomäne (z.B. bestehend aus
- 40 Zinkfingern) zusammensetzen (Smith J et al. (2000) Nucl Acids Res 28(17):3361-3369; Bibikova M et al. (2001) Mol Cell Biol. 21:289-297). So wurde beispielsweise die katalytische Domäne der Restriktionsendonuklease FokI an Zinkfingerbinde-Domänen fusioniert wodurch die Spezifität der Endonuklease definiert
- 45 wurde (Chandrasegaran S & Smith J (1999) Biol Chem 380:841-848; Kim YG & Chandrasegaran S (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:883-887; Kim YG et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA

93:1156-1160). Auch die katalytische Domäne der Ho-Endonuklease aus Hefe konnte bereits mit der beschriebenen Technik eine vordefinierte Spezifität verliehen werden, indem diese an die Zinkfingerdomäne von Transkriptionsfaktoren fusioniert wurde
5 (Nahon E & Raveh D (1998) Nucl Acids Res 26:1233-1239).

Wie erwähnt, eignen sich insbesondere Zinkfingerproteine als DNA-Bindungsdomäne im Rahmen von chimären Nukleasen. Diese DNA-bindenden Zinkfingerdomänen können an jede beliebige DNA-Sequenz
10 angepasst werden. Entsprechende Verfahren zur Herstellung entsprechender Zinkfingerdomänen sind beschrieben und dem Fachmann bekannt (Beerli RR et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(4):1495-1500; Beerli RR et al. (2000) J Biol Chem 275(42):32617-32627; Segal DJ and Barbas CF 3rd. (2000) Curr
15 Opin Chem Biol 4(1):34-39; Kang JS and Kim JS (2000) J Biol Chem 275(12):8742-8748; Beerli RR et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(25):14628-14633; Kim JS et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(8):3616-3620; Klug A (1999) J Mol Biol 293(2):215-218; Tsai SY et al. (1998) Adv Drug Deliv Rev 30(1-3):23-31; Mapp AK et al.
20 (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(8):3930-3935; Sharrocks AD et al. (1997) Int J Biochem Cell Biol 29(12):1371-1387; Zhang L et al. (2000) J Biol Chem 275(43):33850-33860). Verfahren zur Herstellung und Selektion von Zink-Finger DNA-Bindedomänen mit hoher Sequenzspezifität sind beschrieben (WO 96/06166,
25 WO 98/53059, WO 98/53057). Durch Fusion einer so erhaltenen DNA-Bindedomäne an die katalytische Domäne einer Endonuklease (wie beispielsweise der FokI oder Ho-Endonuklease) kann man chimäre Nukleasen mit jeder beliebigen Spezifität herstellen, die als DSBI-Enzyme im Rahmen der vorliegenden Erfindung vorteilhaft
30 eingesetzt werden können.

Künstliche DSBI-Enzyme mit veränderter Sequenzspezifität können auch durch Mutagenese bereits bekannter Restriktionsendonukleasen oder Homing Endonukleasen durch dem Fachmann geläufige Methoden
35 erzeugt werden. Insbesondere von Interesse ist neben der Mutagenese von Homing-Endonukleasen mit dem Ziel, eine veränderte Substratspezifität zu erzielen, auch die Mutagenese von Maturasen. Maturasen haben häufig viele Gemeinsamkeiten mit Homing-Endonukleasen und lassen sich durch wenige Mutationen ggf. in
40 Nukleasen umwandeln. Dies wurde beispielsweise für die Maturase im bi2 Intron der Bäckerhefe gezeigt. Lediglich zwei Mutationen in dem die Maturase kodierenden offenen Leseraster (ORF) reichten aus, diesem Enzym eine Homing-Endonuklease Aktivität zu verleihen (Szczepanek & Lazowska (1996) EMBO J 15:3758-3767).

21

Weitere künstliche Nukleasen können mit Hilfe mobiler Gruppe II Introns und den von ihnen kodierten Proteinen oder Teile dieser Proteine erzeugt werden. Viele mobile Gruppe II Introns bilden mit den von ihnen kodierten Proteinen RNA-Protein-Partikel, die sequenzspezifisch DNA erkennen und schneiden können. Die Sequenzspezifität kann dabei durch Mutagenese von bestimmten Bereichen des Introns (siehe unten) den Bedürfnissen angepasst werden (WO 97/10362).

- 10 Dem Fachmann sind verschiedene Verfahren bekannt, um ein DSBI-Enzym in Plastiden einzubringen oder dort zu exprimieren. Beispielfhaft jedoch nicht einschränkend sind zu nennen:

- 15 a) Nukleäre Expression unter Verwendung plastidärer Transitpeptide

Eine Expressionskassette kodierend für ein DSBI-Enzym-Fusionsprotein kann in der dem Fachmann bekannten Weise konstruiert, in den Zellkern eingeführt und - optional - stabil in die chromosomale DNA integriert werden. Für einen Transport in die Plastiden wird das DSBI-Enzym bevorzugt in Fusion mit einer Plastidenlokalisationssequenz (PLS) exprimiert. Verfahren, an sich nicht in den Plastiden lokalisierte Proteine gezielt in die Plastiden zu transportieren, sowie verschiedene PLS-Sequenzen sind beschrieben (Klosgen RB und Weil JH (1991) Mol Gen Genet 225(2):297-304; Van Breusegem F et al. (1998) Plant Mol Biol 38(3):491-496). Bevorzugt sind PLS, welche nach Translokation des DSBI-Enzyms in die Plastiden vom DSBI-Enzym-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist die PLS, die von der plastidären Nicotiana tabacum Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist. Für die nukleäre Expression sind im Prinzip alle Promotoren geeignet, die eine Expression in Pflanzen ermöglichen. Beispiele sind weiter unten gegeben. Bevorzugt sind konstitutive Promotoren wie der 35S Promotor des CaMV oder der Nitrilase-1 Promotor des nit1 Gens aus Arabidopsis (GenBank Acc.-No.: Y07648.2, Nukleotide 2456 bis 4340; Hillebrand H et al. (1998) Plant Mol Biol 36 (1):89-99; Hillebrand H et al. (1996) Gene 170(2):197-200).

22

Bevorzugte PLS Sequenzen sind:

- 5 i) das Transitpeptid der Isopentenylisomerase (IPP) aus Arabidopsis (GenBank Acc.-No.: NC_003074; Nukleotide 604657 - 604486)
- 10 ii) Transitpeptide abgeleitet von der kleine Untereinheit (SSU) der Ribulosebisphosphatcarboxylase (Rubisco ssu) aus beispielsweise Erbse, Mais, Sonnenblume oder Arabidopsis.
- Arabidopsis thaliana: GenBank Acc.-No.: z.B. AY054581, AY054552;
- 15 - Erbse, GenBank Acc.-No.: z.B. X00806, Nukleotide 1086 bis 1256; X04334, X04333 (Hand JM (1989) EMBO J. 8(11):3195-206). Hier besonders bevorzugt: Expressionskassette und Transitpeptid (Erbse, rbcS3A) aus Vektor pJIT117 (Guerineau F (1988) Nucleic Acids Res 16(23):11380. Besonders bevorzugt ist die Peptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 35. Am meisten bevorzugt für die Verwendung zur Konstruktion von entsprechenden Expressionskonstrukten ist die Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 34.
- 20
- 25 - Mais, GenBank Acc.-No.: z.B. S42568, S42508
- Sonnenblume, GenBank Acc.-No.: Y00431, Nukleotide 301 bis 465.
- 30
- iii) Transitpeptide abgeleitet von Genen der pflanzlichen Fettbiosynthese wie das Transitpeptid des plastidären "Acyl Carrier Protein" (ACP) (z.B. die Arabidopsis thaliana beta-ketoacyl-ACP synthetase 2; GenBank Acc.-
- 35 No.: AF318307), die Stearyl-ACP-Desaturase, β -Ketoacyl-ACP Synthase oder die Acyl-ACP-Thioesterase (z.B. A.thaliana mRNA for acyl-(acyl carrier protein)thioesterase: GenBank Acc.-No.: Z36911).
- 40 iv) das Transitpeptid der GBSSI ("Starch Granule Bound Synthase I")
- v) das Transitpeptid der LHCP II Gene.
- 45 Besonders bevorzugt ist die PLS der plastidären Transketolase aus Tabak (SEQ ID NO: 36). Zur Expression entsprechender Fusionsproteine können im Rahmen dieser Erfindung ver-

5 verschiedene PLS-Nukleinsäurekassetten in den drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragment verwendet werden (der Translationsstart (ATG-Kodon) ist in der NcoI Schnittstelle lokalisiert) (pTP09 SEQ ID NO: 37; pTP10 SEQ ID NO: 38; pTP11 SEQ ID NO: 39).

10 Ein weiteres Beispiel für eine vorteilhaft einzusetzende PLS ist das Transitpeptid der plastidären Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 40). Ganz besonders bevorzugt können die Nukleinsäuresequenzen kodierend für drei Kassetten (entsprechend den drei Leserastern) der PLS der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabidopsis thaliana* verwendet werden (EcoRV/SalI-Kassetten mit ATG; IPP-9 SEQ ID NO: 41; IPP-10
15 SEQ ID NO: 42; IPP-11 SEQ ID NO: 43).

20 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

25 Die für das Transitpeptid kodierende Sequenz kann ganz oder teilweise die Peptidsequenz des Ursprungsproteins umfassen. Eine exakte Bestimmung der für den Transport essentiellen Aminosäurereste ist nicht erforderlich, solange die Funktionalität der PLS - nämlich der Transport in die Plastiden - gewährleistet ist, und die Funktion des DSBI-Enzyms nicht gänzlich zerstört wird. Ganz besonders bevorzugt sind die
30 nachfolgenden PLS-Sequenzen:

35 PLS1: N-MASSSSLTSLSQAILSRVPRHGSASSSQLSPSSLTFSGLKSNPNITTSRRRTPSSAAAAVVRSPAIRASAATETIEKTETAGS-C (SEQ ID NO: 36).
Entspricht der PLS der plastidären Transketolase aus Tabak.

40 PLS2: N-MSASSLFNLPLIRLRSLALSSSFSSFRFAHRPLSSISPRKLPNFRFSGTAMDTKDGSRVDM-C (SEQ ID NO: 40). Entspricht der PLS der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2), wobei das letzte Methionin bevorzugt das Start-Methionin des DSBI Enzymes ist.

45 Die Homing-Endonuklease gemäß SEQ ID NO: 69 stellt ein bevorzugtes Fusionsproteine aus der nativen I-Ppo I Nuklease und der der IPP-Plastidenlokalisationssequenz dar. Bevorzugt

wird dieses Protein durch die Sequenz mit der SEQ ID NO: 68 kodiert.

5 Fusionsproteine aus PLS und DSBI-Enzym sind im Rahmen dieser Erfindung unter dem Begriff des DSBI-Enzyms subsumiert. Wird eine DSBI-Enzym nukleär exprimiert, so wird unter dem DSBI-Enzym bevorzugt ein Fusionsprotein aus PLS und DSBI-Enzym verstanden.

10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Fusionproteine aus DSBI-Enzymen mit Plastidenlokalisationssequenz (PLS) Sequenzen sowie Expressionkassetten enthaltend ein Fusionsprotein aus einer Plastidenlokalisationssequenz (PLS) und einem DSBI-Enzym unter Kontrolle eines im pflanzlichen Zellkern funktionellen Promotors. Entsprechend geeignete
15 Promotoren sind dem Fachmann bekannt und weiter unten beschrieben. Die Expressionskassette kann weitere Elemente, wie beispielsweise Transkriptionsterminatoren und/oder Selektionsmarker beinhalten.

20 b) Expression in Plastiden

Eine Expression in Plastiden kann auch durch direkte Einführung einer Expressionskassette für das DSBI-Enzym in Plastiden, ggf. Integration in die plastidäre DNA und
25 Expression des DSBI-Enzyms erfolgen. In einer bevorzugten Ausführungsform ist diese Expressionskassette in dem die Insertionssequenz umfassenden Transformationskonstrukt enthalten.

30 Dabei können zum einen spezifische Plastiden- oder Chromoplasten-Promotoren - wie unten im Detail beschrieben - zum Einsatz kommen. Eine gezielte plastidäre Expression kann auch erreicht werden, wenn man zum Beispiel einen viralen, bakteriellen oder Bakteriophagen Promotor verwendet, die resultierende Expressionskassette in die plastidäre DNA ein-
35 bringt und die Expression dann durch die korrespondierende virale, bakterielle oder Bakteriophagen RNA-Polymerase induziert. Die korrespondierende RNA-Polymerase kann wiederum auf verschiedene Art und Weise - bevorzugt durch nukleäre Transformation als Fusionsprotein mit einer PLS - in die
40 Plastiden eingebracht werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (WO 95/16783, WO 97/06250, US 5,925,806). Das Einbringen in Plastiden wird bevorzugt mittels Mikroinjektion und besonders bevorzugt mittels Partikelbeschuss durch-
geführt.

c) Einbringen als RNA

Das DSBI-Enzym kann auch durch Einführung der für das DSBI-Enzym kodierenden - beispielsweise in vitro erzeugten - mRNA z.B. über Mikroinjektion, Partikel-Bombardierung (biolistische Verfahren), Polyethylenglykol- oder Liposomen-vermittelte Transfektion in Plastiden eingebracht werden. Diese Ausführungsform ist vorteilhaft, da hier keine DSBI-Enzym kodierenden Sequenzen im Plastom oder Genom verbleiben. Bevorzugt wird die das DSBI-Enzym kodierende RNA durch in vitro Transkription in der dem Fachmann bekannten Weise hergestellt.

d) Einbringen als Protein

Das DSBI-Enzym kann direkt beispielsweise über Mikroinjektion, Partikel-Bombardierung (biolistische Verfahren), Polyethylenglykol-Transfektion oder Liposomen-vermittelte Transfektion in Plastiden eingebracht werden. Diese Ausführungsform ist vorteilhaft, da hier keine DSBI-Enzym kodierenden Sequenzen im Plastom oder Genom verbleiben. Ein entsprechendes Verfahren ist beispielsweise beschrieben bei Segal DJ et al. (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92:806-810.

Das DSBI-Enzym kann als Fusionsprotein mit dem VirE2 oder VirF Protein eines Agrobakterium sowie einer PLS in Pflanzenzellen eingeschleust werden. Entsprechende Verfahren sind beispielsweise für die Cre-Rekombinase beschrieben (Vergunst AC et al. (2000) Science 290:979-982). Diese Ausführungsform ist vorteilhaft, da hier keine DSBI-Enzym kodierenden Sequenzen im Genom verbleiben.

Natürlich sind auch Kombinationen der oben beschriebenen Möglichkeiten denkbar.

Bevorzugt ist die Expressionskassette für das DSBI-Enzym auf der Insertionssequenz oder dem Transformationskonstrukt enthalten.

Bevorzugt wird das DSBI-Enzym gleichzeitig mit oder nach der Einführung der Insertionssequenz in die Plastiden eingebracht bzw. aktiviert. Die Expression bzw. Aktivierung am richtigen Ort und zur richtigen Zeit kann durch verschiedene Ansätze sichergestellt werden:

a) Induzierbare Expression

Die Expression eines DSBI-Enzym kann unter Verwendung eines induzierbaren Promotor, bevorzugt eines chemisch induzierbaren Promotors, gesteuert werden. Dazu kann beispielsweise die für das DSBI-Enzym kodierende Expressionskassette stabil in die plastidäre oder nukleäre DNA einer Masterpflanze transformiert werden. Erfolgt die Transformation in das Kerngenom, so muss - wie oben beschriebene - die subzelluläre Lokalisation durch geeignete PLS-Transitpeptide sichergestellt werden. Kurz vor oder während der Transformation mit der Insertionssequenz oder dem Transformationskonstrukt wird dann in Abhängigkeit von dem gewählten induzierbaren System die Expression des DSBI-Enzyms durch Applikation des entsprechenden Induktors eingeschaltet. Dem Fachmann sind verschiedene Verfahren oder Promotoren zur induzierten Expression bekannt. Als Stimulus können chemische Substanzen oder auch physikalische Stimuli wie beispielsweise erhöhte Temperatur oder Verwundung etc. fungieren. Verschiedene Beispiele sind weiter unten beschrieben.

b) Induzierbare Aktivität

Das DSBI-Enzym kann bereits in den Plastiden der Masterpflanze vorliegen, wenn die Aktivität durch geeignete Techniken erst zum gewählten Zeitpunkt etwa durch Zugabe chemischer Substanzen induziert wird. Entsprechende Verfahren sind für sequenzspezifische Rekombinasen beschrieben (Angrand PO et al. (1998) Nucl Acids Res 26(13):3263-3269; Logie C und Stewart AF (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92(13):5940-5944; Imai T et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98(1):224-228). Bei diesen Verfahren werden Fusionsproteine aus dem DSBI-Enzym und der Ligandenbindedomäne eines Steroidhormonrezeptors (z.B. des humanen Androgenrezeptors, oder mutierte Varianten des humanen Estrogenrezeptors wie dort beschrieben) eingesetzt. Die Induktion kann mit Liganden wie beispielsweise Estradiol, Dexamethason, 4-Hydroxytamoxifen oder Raloxifen erfolgen.

Manche DSBI-Enzyme sind als Dimer (Homo- oder Heterodimer) aktiv (I-CreI bildet ein Homodimer; I-PpoI bildet Homodimer, Flick KE et al. (1998) Nature 394: 96-101). Allgemein neigen Enzyme der LAGLIDADG Familie dazu, Homodimere zu bilden, wenn sie je Monomer nur ein LAGLIDADG Motiv enthalten (Jurica MS & Stoddard BL (1999) Cell Mol Life Sci 55:1304-1326; beispielhaft sei I-CeuI genannt). Eine Dimerisierung kann induzierbar gestaltet werden, indem beispielsweise die natürlichen

Dimerisierungsdomänen gegen die Bindungsdomäne eines niedermolekularen Liganden ausgetauscht werden. Zugabe eines dimeren Liganden bewirkt dann Dimerisierung des Fusionsproteins. Entsprechende induzierbare Dimerisierungsverfahren als auch die Herstellung der dimeren Liganden sind beschrieben (Amara JF et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(20): 10618-1623; Muthuswamy SK et al. (1999) Mol Cell Biol 19(10): 6845-6857; Schultz LW und Clardy J (1998) Bioorg Med Chem Lett 8(1):1-6; Keenan T et al. (1998) Bioorg Med Chem. 6(8):1309-1335).

c) Cotransfektion

Bevorzugt wird die Expressionskassette kodierend für das DSBI-Enzym gleichzeitig mit der Insertionssequenz in die Plastiden eingebracht. Dabei können die Expressionskassette für das DSBI-Enzym und die Insertionssequenz auf einem DNA-Molekül oder auf zwei getrennten vorliegen. Bevorzugt liegen die beiden Sequenzen auf einem DNA-Molekül zusammen vor, so dass die Expressionskassette in dem die Insertionssequenz umfassenden Transformationskonstrukt enthalten ist.

Dabei wird in einer besonders bevorzugten Ausführungsform, nachdem homoplastome Pflanzen regeneriert wurden, die Sequenz kodierend für das DSBI-Enzym aus dem Genom der transformierten Plastiden wieder entfernt. Dem Fachmann sind dazu verschiedene Verfahren bekannt, die weiter unten im Detail beschrieben sind.

Manche der oben beschriebenen DSBI-Enzyme (insbesondere Homing Endonukleasen) können in dem bevorzugt genutzten Zwischenwirt *E. coli* Erkennungssequenzen aufweisen. Da zudem manche Expressionskassetten zur Expression in Plastiden auch in *E. coli* funktionell sind, wird bevorzugt die Expression des DSBI-Enzyms in *E. coli* auf verschiedene dem Fachmann geläufige Art verhindert, um während der Amplifikation der Expressionskassette etwaige nachteilige Effekte auf *E. coli* zu vermeiden. So können beispielsweise mehrere, aufeinander folgende für *E. coli* seltene Codons (z.B. die für Arginin kodierenden Kodons AGA und AGG) in den Leserahmen des DSBI-Enzyms eingefügt werden. Dies verhindert die Expression in *E. coli*, ermöglicht jedoch weiterhin - aufgrund der unterschiedlichen Kodonnutzung - eine Expression in den Plastiden. Alternativ können Promotoren genutzt werden, die nicht in *E. coli* wohl aber in den Plastiden höherer Pflanzen aktiv sind (z.B. Promotoren der nukleär kodierten plastidären RNA-Polymerasen [NEP-Promotoren; s.u.]). Eine bevorzugte Methode ist die Verwendung von Promotoren, die weder von den Plastiden noch

von E. coli erkannt werden (z.B. virale oder Bakteriophagen Promotoren), die erst durch das gleichzeitige Vorhandensein der entsprechenden viralen/Bakteriophagen RNA Polymerase funktionell werden. Entsprechende Verfahren sind dem Fachmann bekannt und 5 unten beschrieben. Ferner wäre es denkbar, die entsprechenden DSB-Erkennungssequenzen in E. coli zu zerstören oder einen anderen Wirt zu benutzen, der keine DSB-Erkennungssequenzen für das jeweilige DSBI-Enzym besitzt. Des weiteren ist es denkbar und vorteilhaft, die kodierende Region des DSBI-Enzyms zur 10 Amplifikation in E. coli promotorlos vorliegen zu haben. In diesem Fall ist die für das DSBI-Enzym kodierende Sequenz bevorzugt auf einem Plasmid enthalten, welches in das plastidäre Genom der zu transformierenden Pflanze integrieren kann. Dabei kann der Integrationsort derart gewählt werden, dass das Gen kodierend 15 für das DSBI-Enzym unter die Kontrolle eines natürlicherweise oder künstlich eingefügt im Plastom vorhandenen Promotors gelangt und es daher in den Plastiden zur Expression des DSBI-Enzyms kommt. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird dafür gesorgt, dass das Gen kodierend für das DSBI-Enzym wieder aus dem 20 Plastom deletiert werden kann (siehe unten). Darüber hinaus ist es möglich, eine Verknüpfung zwischen einem Promotor und einem DSBI-Enzym zu erstellen, indem ein solcher in vitro mittels dem Fachmann geläufige PCR Techniken stromaufwärts des offenen Leserahmens angefügt wird. Das PCR Produkt kann dann genutzt werden, 25 um es in die pflanzlichen Plastiden einzubringen. Außerdem können nicht-funktionelle Teile einer Expressionskassette für ein DSBI-Enzym erstellt und in E. coli amplifiziert werden, wenn diese nach dem Einbringen in pflanzliche Plastiden miteinander rekombinieren (beispielsweise durch homologe Rekombination in überlap- 30 penden Bereichen der nicht-funktionellen Anteile der Expressionskassette) und so eine funktionelle Expressionskassette ergeben.

"Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen" (infolge "DSB-Erkennungssequenz" für Doppelstrangbruch- 35 Erkennungssequenz) meint allgemein solche Sequenzen, die unter den Bedingungen in den Plastiden der jeweils verwendeten pflanzlichen Zelle oder Pflanze die Erkennung und Spaltung durch ein DSBI-Enzym erlauben. Besonders bevorzugt sind DSB-Erkennungssequenzen für Homing-Endonukleasen, die natürlicherweise in Mitochondrien oder Kern anderer Organismen kodiert sind. Es können 40 auch DSB-Erkennungssequenzen der Homing-Endonukleasen genutzt werden, die aus Plastiden (beispielsweise von Grünalgen) stammen. Bevorzugt ist die DSB-Erkennungssequenz singulär in der plastidären DNA, d.h. ein Doppelstrangbruch wird nur an der so vor- 45 definierten Stelle erzeugt. Es sind jedoch auch Fälle denkbar, bei denen mehr als eine DSB-Erkennungssequenz im Plastom vorhanden ist. Dies ist insbesondere der Fall, wenn die DSB-

Erkennungssequenz in duplizierten Genen (z.B. in invertierten "Repeats") lokalisiert ist. Im letzteren Fall liegen mehr als eine identische DSB-Erkennungssequenz vor, ihr Kontext ist jedoch identisch, so dass auch hier eine gezielte Insertion erfolgt. Es ist sogar bevorzugt, dass die Integration in alle Kopien erfolgt, so dass auch ein Schnitt in allen Kopien erforderlich ist. DSB-Erkennungssequenzen, die zwar mehr als einmal in einem Plastom auftreten, jedoch im gleichen plastomen Kontext lokalisiert sind (z.B. in "Repeats" oder Genduplikationen) sind im Rahmen dieser Erfindung unter dem Begriff der singulären DSB-Erkennungssequenzen subsumiert.

Bevorzugt ist die eingesetzte Pflanze oder von dieser abgeleitete Zelle bezüglich der DSB-Erkennungssequenz überwiegend homoplastom oder homotransplastom, d.h. dass die überwiegende Anzahl der in einem Plastid enthaltenen plastidären DNA-Moleküle diese DSB-Erkennungssequenz aufweisen. Solche Pflanzen werden auch als Masterpflanzen im Rahmen dieser Erfindung bezeichnet.

Prinzipiell können zwei Arten von DSB-Erkennungssequenzen genutzt werden:

a) Natürliche, endogene DSB-Erkennungssequenzen

Wie im Rahmen dieser Erfindung gezeigt werden konnte, enthalten die Plastome höherer Pflanzen verschiedene Sequenzen, die als Erkennungssequenzen für DSB-Enzyme (beispielsweise Homing-Endonukleasen) fungieren können, auch wenn für höhere Pflanzen bislang keine solchen Endonukleasen nachgewiesen werden konnten. Solche DSB-Erkennungssequenzen können mittels Durchmusterung der plastidären DNA-Sequenz unter Verwendung der bekannten DSB-Erkennungssequenzen (beispielsweise der in Tabelle 2 beschriebenen) identifiziert werden. Das plastidäre Genom verschiedener Pflanzen ist bekannt (http://megasun.bch.umontreal.ca/ogmp/projects/other/cp_list.html). Berichtet sind die Sequenzen der Plastome von

- *Arabidopsis thaliana* (Sato S et al. (1999) DNA Res. 6 (5):283-290) (GenBank Acc.-No.: AP000423; NCBI Acc.-No. NC_000932)
- *Epifagus virginiana* (Beechdrops; Wolfe KH et al. (1992) J Mol Evol 35(4):304-317; NCBI Acc.-No.: NC_001568; GenBank Acc.-No.: M81884)

- Lotus japonicus (Kato T et al. (2000) DNA Res 7(6):323-330; NCBI Acc.-No.: NC_002694; GenBank Acc.-No.: AP002983)
- 5 - Oryza sativa (Reis) (Hiratsuka J et al. (1989) Mol Gen Genet 217(2-3):185-194; NCBI Acc.-No.: NC_001320; GenBank Acc.-No.: X15901),
- 10 - Marchantia polymorpha (Liverwort; Ohyama K et al. (1988) J Mol Biol 203(2):281-298; Yamano Y et al. (1984) Nucl Acids Res 12(11):4621-4624; GenBank Acc.-No.: X04465 und Y00686; NCBI Acc.-No.: NC_001319)
- 15 - Nicotiana tabacum (Tabak) (GenBank Acc.-No.: Z00044 und S54304; NCBI Acc.-No.: NC_001879; Shinozaki K et al. (1986) EMBO J 5:2043-2049)
- 20 - Oenothera elata ssp. hookeri (Monterey evening primrose; GenBank Acc.-No.: AJ271079; NCBI Acc.-No.: NC_002693; Hupfer H et al. (2000) Mol Gen Genet 263(4):581-585)
- 25 - Medicago truncatula (Gen Bank Acc.-No.: AC093544)
- Pinus thunbergii (black pine; Tsudzuki J et al. (1994) Curr Genet 26(2):153-158; NCBI Acc.-No.: NC_001631; GenBank Acc.-No.: D17510)
- 30 - Spinacia oleracea (GenBank Acc.-No.: AJ400848 J01442 M12028 M16873 M16878 M27308 M55297 X00795 X00797 X01724 X04131 X04185 X05916 X06871)
- Triticum aestivum (Weizen; GenBank Acc.-No.: AB042240; NCBI Acc.-No.: NC_002762) und
- 35 - Zea mays (GenBank Acc.-No.: X86563; NCBI Acc.-No.: NC_001666)

40 Darüber hinaus können weitere Plastome sequenziert werden, um auch dort DSB-Erkennungsstellen zu identifizieren. Es ist im allgemeinen ausreichend, hoch konservierte Regionen aus dem Plastom durch dem Fachmann geläufige PCR-Methoden zu isolieren und nur diese zu sequenzieren.

45 Ferner können natürliche, endogene DSB-Erkennungsstellen experimentell ermittelt werden, indem man beispielsweise die plastidäre DNA isoliert (z.B. nach Mariac P et al. (2000) BioTechniques 28:110-113), die zu betrachteten Fragmente des Plastidengenoms mittels PCR amplifiziert oder synthetische

Fragmente nutzt und mit dem jeweiligen DSBI-Enzym eine Restriktionsanalyse durchführt. Diese wird bevorzugt unter Bedingungen durchgeführt, wie sie im Plastid einer höheren Pflanze vorliegen.

5

Die im Rahmen dieser Erfindung identifizierten und in Tabelle 1 beschriebenen endogenen DSB-Erkennungssequenzen für natürliche Homing-Endonukleasen liegen darüberhinaus in den konservierten Regionen des Plastoms, so dass - insbesondere unter Berücksichtigung der gegebenen Variabilität der entsprechend genannten Homing-Endonukleasen bezüglich ihrer jeweiligen Erkennungssequenzen - davon ausgegangen werden kann, dass diese Erkennungssequenzen nahezu universell in allen Plastomen höherer Pflanzen vorkommen. Hinter den in Tabelle 1 angegebenen Positionen verbirgt sich jeweils die angegebene Sequenz und die reverskomplementäre, da alle in Tabelle 1 angegebenen Erkennungsregionen in den "Inverted Repeats" des Plastidengenoms lokalisiert sind. Von den in Tabelle 1 genannten Homing-Endonukleasen sind besonders bevorzugt I-CpaI, I-CeuI, I-ChuI, I-CpaII und I-CreI.

10

15

20

25

30

35

40

45

Die so identifizierten Erkennungssequenzen können für die Insertion von Fremd-DNA genutzt werden, indem durch Einführung des entsprechenden DSBI-Enzyms ein Doppelstrangbruch erzeugt wird. Sollte die DSB-Erkennungssequenz in einer hochkonservierten Region innerhalb eines Gens des Organellengenoms liegen, so wird die Fremd-DNA bevorzugt in Form eines selbstspleißenden Introns insertiert, was die Rekonstitution der mRNA des betroffenen Gens ermöglicht (s.u.).

Dem Fachmann sind ferner Verfahren bekannt, nach denen eine beliebige endogene Sequenz als Erkennungssequenz für chimäre, mutierte oder künstliche Endonukleasen fungieren kann, indem deren DNA-Erkennungsregion - beispielsweise durch Modifizieren einer an eine Endonuklease-Domäne fusionierten Zink-Finger-Domäne oder Modifizieren der RNA-Sequenz eines Gruppe II Intron-RNA-Protein Komplexes - gezielt verändert wird (s.o.; WO 96/06166, Bibikova M et al. (2001) Mol Cell Biol 21:289-297).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

DSBI-Enzym	Publizierte DSB Erkennungssequenz	Sequenz im Plastom	Position im Tabakplastom Acc. Z00044	Position im Weizenplastom Acc. AB042240	Position im Reisplastom Acc. X159019	Position im Maisplastom Acc. X86563	Position im Arabidopsis- plastom Acc. AP000423
I-DmoI	ATGCGCGCGAACT TACCCGGCAAGGCAT	GTGCGGTCGGAACCT ACCCGACAGGAAT	c(108281-108310) 134316-134345	118010-118039 c(96855-96884)	117846-117875 c(97243-97272)	121617-121646 c(101091-101120)	131977-132006 c(106643-106672)
I-CpaI	CGATCCTAAGGTAGC GAAATCA	CGTCCTAAGGTAGCG AAATTC	108263-108285 c(134341-134363)	96837-96859 c(118035-118057)	97224-97246 c(117871-117893)	101073-101095 c(121642-121664)	106625-106647 c(132002-132024)
I-CeuI	CGTAACATAACGGT CCTAAGGTAGCGAA	CGTAACATAACGGTC CTAAGGTAGCGAA	c(134346-134374) 108252-108280	c(118040-118068) 96826-96854	c(117876-117904) 97214-97242	101062-101090 c(121647-121675)	c(132007-132035) 106614-106642
I-ChuI	GAAGGTTTGGCACCT CGATGTCGGCTCATC	GAAGGTTTGGCACCTC GATGTCGGCTCTTC	108832-108861 c(133765-133794)	97405-97434 c(117460-117489)	97792-97821 c(117297-117326)	101641-101670 c(121067-121096)	107194-107223 c(131426-131455)
I-CpaII	CCGGCTAACTCTGT GCCAG	ATCGGCTAACTCTGTG CCAG	c(139398-139417) 103209-103228	c(123374-123393) 91501-91520	c(123351-123370) 91748-91767	c(127108-127127) 95610-95629	c(137169-137188) 101461-101480
I-CreI	CTGGGTTCAAACGT CGTAGACAGTTTGG	CTGGGTTCAGAACGTC GTGAGACAGTTCCG	108925-108954 c(133672-133701)	97498-97527 c(117367-117396)	97885-97914 c(117204-117233)	abweichende Sequenz: ctgggttcagaac gtcgtgagacgtt cgg c(120975-121003) 101734-101762	107287-107316 c(131333-131362)
I-SceI	TACCCGTGTATCCCT AGCGTAAC	CAGCCTGTATCCCTA GAGTAAC	c(108804-108781) 133822-133845	c(97377-97354) 117516-117540	c(97741-97764) 117354-117377	c(101590-101613) 121124-121147	c(107143-107166) 131483-131506

Tab 1: Bevorzugte, endogene Schnittstellen in den plastidären Genomen von Tabak, Weizen, Reis, Mais und Arabidopsis. c=komplementär. AccNo: GenBank Accession-Number (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

33

Darüber hinaus liegen singuläre Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen im Plastidengenom vor. Diese befinden sich jedoch meist in weniger hoch konservierten Regionen und sind daher nicht unbedingt universell in allen Pflanzenarten nutzbar. Beispielhaft sind zu nennen:

- a) Das Enzym SfiI hat im Plastidengenom von Arabidopsis (GenBank Acc.-No.: AP000423) an der Position 40846-40858 mit der Sequenz GGCCTTTATGGCC eine singuläre Erkennungsstelle.
- b) Im Plastidengenom von Mais (GenBank Acc.-No.: X86563) gibt es eine singuläre Schnittstelle für das Enzym AscI an der Position 42130-42137 mit der Sequenz GGCGCGCC.
- c) Im Plastidengenom von Reis (GenBank Acc.-No.: X159019) gibt es eine singuläre Schnittstelle für das Enzym SgfI an der Position 77309-77316 mit der Sequenz GCGATCGC sowie für das Enzym AscI an der Position 39776-39783 mit der Sequenz GGCGCGCC.
- d) Im Plastidengenom von Tabak (Accession Z00044) gibt es je eine singuläre Schnittstelle für das Enzym SfiI an der Position 42475-42487 mit der Sequenz GGCCTTTATGGCC, für das Enzym SgrI an der Position 78522-78529 mit der Sequenz CACCGGCG, sowie für das Enzym PmeI an der Position 120895-120902 mit der Sequenz GTTTAAAC.
- e) Im Plastidengenom von Weizen (Accession AB042240) gibt es je eine singuläre Schnittstelle für das Enzym PmeI an der Position 59331-59338 mit der Sequenz GTTTAAAC, für die Enzyme NarI, KanI, EheI und BbeI eine singuläre Schnittstelle an der Position 41438-41443 mit der Erkennungssequenz GGCGCC, sowie für das Enzym SfiI eine Erkennungsregion an der Position 112656-112668 mit der Sequenz GGCCCAGGGGGCC.

All diese Pflanzen mit endogenen, natürlichen DSB-Erkennungssequenzen stellen quasi natürlich vorkommende "Masterpflanzen" dar. Bei ihnen ist die DSB-Erkennungssequenz natürlicherweise homoplastom vorhanden. Dies erübrigt die Einführung und Selektion künstlicher DSB-Erkennungssequenzen.

b) Künstlich eingeführte DSB-Erkennungssequenzen

- Dem Fachmann ist bewusst, dass die in eine Masterpflanze eingebrachte Erkennungsregion für ein selten schneidendes Enzym nicht natürlich sein muss. Prinzipiell kann jede Erkennungssequenz eines beliebigen DSB-Enzyms an jede beliebige Stelle der plastidären DNA insertiert werden. Die Herstellung erfolgt bevorzugt unter Verwendung eines Konstrukts zur Insertion der DSB-Erkennungssequenz (infolge DSBE-Konstrukt). Bevorzugt umfasst das DSBE-Konstrukt einen Selektionsmarker, um die zur Erzeugung entsprechender Masterpflanzen erforderliche Selektion transplastomer Pflanzen mit der erfolgreich insertierten DSB-Erkennungssequenz zu erleichtern. Dem Fachmann sind verschiedene Selektionsmarker bekannt, die eine Selektion von Plastiden ermöglichen (s.u.). Bevorzugt sind *aadA*, *nptII* oder *BADH*, wobei *aadA* besonders bevorzugt ist. Die Selektion erfolgt beispielsweise mit Hilfe des dem Fachmann bekannten "segregation and sorting" Prozess (beispielfhaft unter Beispiel 4 beschrieben). Der Selektionsmarker ist bevorzugt so konstruiert, dass eine nachfolgende Deletion aus dem Plastom ermöglicht wird. Entsprechende Verfahren sind dem Fachmann bekannt und unten beschrieben.
- Bevorzugt wird so zunächst eine bezüglich der insertierten DSB-Erkennungssequenz homotransplastome Pflanze erzeugt, die eine DSB-Erkennungssequenz in allen oder der überwiegenden Anzahl der Plastiden der betrachteten Pflanze besitzen. Solche Pflanzen können vorteilhaft als Masterpflanzen eingesetzt werden.
- Das DSBE-Konstrukt kann neben dem Selektionsmarker weitere Sequenzen enthalten. Diese können beispielsweise weitere regulatorische Elemente für die Expression der infolge einzuführenden Insertionssequenzen enthalten. Der im Rahmen des Konstruktes zur Insertion der DSB-Erkennungssequenz eingeführte Selektionsmarker wird in einer bevorzugten Ausführungsform nach Erhalt der homoplastomen Masterpflanze durch dem Fachmann bekannte Verfahren deletiert (s.u.).
- In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das DSBE-Konstrukt zur Ermöglichung einer ortsspezifischen Insertion an mindestens einer, bevorzugt an beiden Seiten der DSB-Erkennungssequenz weitere flankierende Sequenzen, die eine ausreichende Länge und Homologie zu entsprechenden Zielsequenzen im Plastom haben, um eine ortsspezifische Insertion mittels homologer Rekombination zu gewährleisten.

Aufgrund der Vielzahl der im Stand der Technik beschriebenen DSBI-Enzyme mit definierten Erkennungssequenzen, ist es möglich und bevorzugt, Master-Pflanzen zu erzeugen, die mehrere verschiedene singuläre DSB-Erkennungssequenzen in ihr plastidäres Genom eingebaut haben.

Beispielhaft aber nicht einschränkend seien dabei in nachfolgender Tabelle 2 die Erkennungssequenzen für die jeweiligen aufgeführten DSBI-Enzyme genannt.

10

Tabelle 2: Erkennungssequenzen und Herkunftsorganismus von DSBI-Enzymen ("^" gibt innerhalb einer Erkennungssequenz die Schnittstelle des DSBI-Enzyms an.)

DSBI-Enzym	Herkunftsorganismus	Erkennungssequenz
I-AniI	Aspergillus nidulans	5'-TTGAGGAGGTT^TCTCTGTAAATAANNNNNNNNNNNNNNNN 3'-AACTCCTCCAAAGAGACATTATNNNNNNNNNNNNNNNN^
I-CvuI	Chlorella vulgaris	5'-CTGGGTTCAAAACGTCGTGA^GACAGTTTGG 3'-GACCCAAGTTTGCAG^CACTCTGTCAAACC
I-CsmI	Chlamydomonas smithii	5'-GTACTAGCATGGGGTCAAATGTCTTTCTGG
I-CmoI	Chlamydomonas moewusii	5'-TCGTAGCAGCT^CACGGTT 3'-AGCATCG^TCGAGTGCCAA
I-CreI	Chlamydomonas reinhardtii	5'-CTGGGTTCAAAACGTCGTGA^GACAGTTTGG 3'-GACCCAAGTTTGCAG^CACTCTGTCAAACC
I-ChuI	Chlamydomonas humicola	5'-GAAGGTTTGGCACCTCG^ATGTCGGCTCATC 3'-CTTCCAAACCGTG^GAGCTACAGCCGAGTAG
I-CpaI	Chlamydomonas pallidostigmatica	5'-CGATCCTAAGGTAGCGAA^ATTCA 3'-GCTAGGATTCATC^GCTTTAAGT
I-CpaII	Chlamydomonas pallidostigmatica	5'-CCC GGCTAACTC^TGTGCCAG 3'-GGGCCGAT^TGAGACACGGTC
I-CeuI	Chlamydomonas eugametos	5'-CGTA ACTATAACGGTCCTAA^GGTAGCGAA 3'-GCATTGATATTGCCAG^GATTCCATCGCTT
I-DmoI	Desulfurococcus mobilis	5'-ATGCC TTGCCGGTAA^GTTCGGCGCGCAT 3'-TACGGAACGGCC^CATTCAAGGCCGCGCGTA
I-SceI	Saccharomyces cerevisiae	5'-AGTTACGCTAGGGATAA^CAGGGTAATATAG 3'-TCAATGCCGATCCC^TATTGTCCCATATATC 5'-TAGGGATAA^CAGGGTAAT 3'-ATCCC^TATTGTCCCATTA ("Core"-Sequenz)
I-SceII	Saccharomyces cerevisiae	5'-TTTTGATTCTTTGGTCACCC^TGAAGTATA 3'-AAACTAAGAAACCAG^TGGGACTTCATAT
I-SceIII	Saccharomyces cerevisiae	5'-ATTGGAGTTTGGTAAC^TATTTATTACC 3'-TAACCTCCAAACC^ATTGATAAATAATGG
I-SceIV	Saccharomyces cerevisiae	5'-TCTTTTCTCTTGATTA^GCCCTAATCTACG 3'-AGAAAAGAGAAC^TAATCGGGATTAGATGC
I-SceV	Saccharomyces cerevisiae	5'-AATAATTTTCT^TCTTAGTAATGCC 3'-TTATTAAAGAAGATCATTA^CGG

DSBI-Enzym	Herkunfts- organismus	Erkennungssequenz
I-SceVI	Saccharomyces cerevisiae	5'-GTTATTTAATG^TTT TAGTAGTTGG 3'-CAATAAATTACAAAATCATCA^ACC
5 I-SceVII	Saccharomyces cerevisiae	5'-TGTCACATTGAGGTGCACTAGTTATTAC
PI-SceI	Saccharomyces cerevisiae	5'-ATCTATGTCGGGTGC^GGAGAAAGAGGTAAT 3'-TAGATACAGCC^CACGCCTCTTTCTCCATTA
F-SceI	Saccharomyces cerevisiae	5'-GATGCTGTAGGC^ATAGGCTTGGTT 3'-CTACGACA^TCCGTATCCGAACCAA
10 F-SceII	Saccharomyces cerevisiae	5'-CTTCCGCAACA^GTAAAATT 3'-GAAAGGCG^TTGTCATTTTAA
I-LlaI	Lactococcus lactis	5'-CACATCCATAAC^CATATCATTTTT 3'-GTGTAGGTATTGGTATAGTAA^AAA
15 I-MsoI	Monomastix species	5'-CTGGGTTCAAAACGTCGTGA^GACAGTTTGG 3'-GACCCAAGTTTTGCAG^CACTCTGTCAAACC
I-NanI	Naegleria andersoni	5'-AAGTCTGGTGCCA^GCACCCGC 3'-TTCAGACC^ACGGTCGTGGGCG
I-NitI	Naegleria italica	5'-AAGTCTGGTGCCA^GCACCCGC 3'-TTCAGACC^ACGGTCGTGGGCG
20 I-NjaI	Naegleria jamiesoni	5'-AAGTCTGGTGCCA^GCACCCGC 3'-TTCAGACC^ACGGTCGTGGGCG
I-PakI	Pseudendoclo- nium akinetum	5'-CTGGGTTCAAAACGTCGTGA^GACAGTTTGG 3'-GACCCAAGTTTTGCAG^CACTCTGTCAAACC
I-PorI	Pyrobaculum organotrophum	5'-GCGAGCCCGTAAGGGT^GTGTACGGG 3'-CGCTCGGGCATT^CCCACACATGCC
25 I-PpoI	Physarum po- lycephalum	5'-TAAGTATGACTCTCTTAA^GGTAGCCAAAT 3'-ATTGATACTGAGAG^AATTCCATCGGTTTA "Core Sequenz": CTCTCTTAA^GGTAGC GAGAG^AATTCCATCG
30 I-ScaI	Saccharomyces capensis	5'-TGTCACATTGAGGTGCACT^AGTTATTAC 3'-ACAGTGTAACCTCCAC^GTGATCAATAATG
I-Ssp6803I	Synechocystis species	5'-GTCGGGCT^CATAACCCGAA 3'-CAGCCCGAGTA^TTGGGCTT
PI-PfuI	Pyrococcus furiosus Vcl	5'-GAAGATGGGAGGAGGG^ACCGGACTCAACTT 3'-CTTCTACCTCC^TCCCTGGCCTGAGTTGAA
35 PI-PfuII	Pyrococcus furiosus Vcl	5'-ACGAATCCATGTGGAGA^AGAGCCTCTATA 3'-TGCTTAGGTACAC^CTCTCTCGGAGATAT
PI-PkoI	Pyrococcus kodakaraensis KOD1	5'-GATTTTATAGAT^CCCTGTACC 3'-CTAAAA^TCTAGGGACATGG
40 PI-PkoII	Pyrococcus kodakaraensis KOD1	5'-CAGTACTACG^GTTAC 3'-GTCATG^ATGCCAATG
PI-PspI	Pyrococcus sp.	5'-AAAATCCTGGCAAACAGCTATTAT^GGGTAT 3'-TTTTAGGACCGTTTGTTCGAT^AATACCCATA
45 PI-TfuI	Thermococcus fumicolans ST557	5'-TAGATTTTATAGGT^CGCTATATCCTTCC 3'-ATCTAAAA^TCCAGCGATATAGGAAGG

DSBI-Enzym	Herkunftsorganismus	Erkennungssequenz
5 PI-TfuII	Thermococcus fumicolans ST557	5'-TAYGCNGAYACN^GACGGYTTYT 3'-ATRCGNCT^RTGNCTGCCRAARA
PI-ThyI	Thermococcus hydrotherma- lis	5'-TAYGCNGAYACN^GACGGYTTYT 3'-ATRCGNCT^RTGNCTGCCRAARA
PI-TliI	Thermococcus litoralis	5'-TAYGCNGAYACNGACGG^YTTYT 3'-ATRCGNCTRTGNC^TGCCRAARA
10 PI-TliII	Thermococcus litoralis	5'-AAATTGCTTGCAAACAGCTATTACGGCTAT
I-TevI	Bacteriophage T4	5'-AGTGGTATCAAC^GCTCAGTAGATG 3'-TCACCATAGT^TGCGAGTCATCTAC
I-TevII	Bacteriophage T4	5'-GCTTATGAGTATGAAGTGAACACGT^TATTC 3'-CGAATACTCATACTTCACTTGTG^CAATAAG
15 F-TevI	Bacteriophage T4	5'-GAAACACAAGA^AATGTTTAGTAAANNNNNNNNNNN 3'-CTTTGTGTTCTTTACAAATCATTTNNNNNNNNNNNNN^
F-TevII	Bacteriophage T4	5'-TTTAATCCTCGCTTC^AGATATGGCAACTG 3'-AAATTAGGAGCGA^AGTCTATACCGTTGAC

20

Dabei sind auch Abweichungen (Degenerationen) der Erkennungssequenz umfasst, die dennoch eine Erkennung und Spaltung durch das jeweilige DSBI-Enzym ermöglichen. Derartige Abweichungen - auch in Zusammenhang mit unterschiedlichen Rahmenbedingungen wie beispielsweise Calcium oder Magnesium-Konzentration - sind beschrieben (Argast GM et al. (1998) J Mol Biol 280: 345-353). Ferner sind Kernsequenzen ("Core"-Sequenzen) dieser Erkennungssequenzen umfasst. Es ist bekannt, dass auch die inneren Anteile der Erkennungssequenzen für einen induzierten Doppelstrangbruch

30 genügen und dass die äußeren nicht unbedingt relevant sind, jedoch die Effizienz der Spaltung mitbestimmen können. So kann beispielsweise für I-SceI eine 18bp-"Core"-Sequenz definiert werden. Der Begriff der DSB-Erkennungssequenz umfasst insofern auch alle wesentlichen gleichen Erkennungssequenzen. Im wesentlichen gleiche Erkennungssequenzen meint solche Erkennungssequenzen, die zwar Abweichungen von der für das jeweilige Enzym als optimal gefundenen Erkennungssequenz aufweisen, jedoch eine Spaltung durch dasselbe noch erlauben.

40 Es sind verschiedene Orte der Lokalisation (bei bereits vorhandenen endogenen DSB-Erkennungssequenzen) bzw. Integration (bei künstlich generierten DSB-Erkennungssequenzen) für die DSB-Erkennungssequenz möglich. Beispielfhaft seien zu nennen:

45

38.

- a) Lokalisation (Integration) in einer transkriptionell stillen Region

5 Lokalisation (Integration) der DSB-Erkennungssequenz in einer transkriptionell stillen Region des Plastidengenoms (intergenische Region) ist die bevorzugte Ausführungsform. Eine Störung der plastidären Funktionen kann so weitgehend ausgeschlossen werden. Hierbei ist zu beachten, dass für eine Expression gegebenenfalls entsprechende regulatorische
10 Elemente wie Promotoren etc. mit eingebracht werden müssen.

- b) Lokalisation (Integration) in eine transkriptionell aktive, aber nicht-kodierende (intercistronische) Region

15 Diese Lokalisation (Integration) hat den Vorteil, dass dadurch die einzubringende Insertionssequenz letztendlich in einem plastidären Operon kodiert ist und Promotor(en) bzw. Terminator(en) nicht gesondert mit eingebracht werden müssen, sondern die endogen an diesem Locus vorhandenen ausgenutzt
20 werden können (aber nicht müssen). Es sollten in einem solchen Fall lediglich Ribosomenbindestellen in geeignetem Abstand stromaufwärts der kodierenden Region der einzubringenden Fremd-Gene vorhanden sein.

25 Es ist jedoch auch denkbar, dass eine intergenische Region nicht vollständig transkriptionell still ist, weil beispielsweise eine nur ineffiziente Termination der Transkription von einem benachbarten Gen oder Operon erfolgt.

- 30 c) Lokalisation (Integration) in eine transkriptionell aktive, kodierende Regionen.

Die unter a) und b) beschriebene Lokalisation (Integration) der DSB-Erkennungssequenz an einem nicht kodierenden Locus,
35 hat den Vorteil, dass die Insertion der Fremd-DNA die Funktion des Plastidengenoms mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht beeinflusst. Nicht-kodierende Bereiche sind jedoch weniger konserviert als kodierende. Um ein möglichst universelles Verfahren zu haben, dass in vielen Pflanzenarten funktioniert, ist in einer besonders bevorzugten Ausführungsform,
40 die DSB-Erkennungssequenz (und infolge die Insertionssequenz) in der kodierende Sequenz eines bestehenden Gens lokalisiert. Die Zerstörung der Genfunktion durch die Einführung der DSB-Erkennungssequenz (bei einer künstlich generierten DSB-Erkennungssequenz) oder die Einführung der Insertionssequenz
45 wird auf erfinderische Weise dadurch verhindert, dass die DSB-Erkennungssequenz bzw. die Insertionssequenz in einer

bevorzugten Variante dieser Ausführungsform im Rahmen eines Introns eingebracht wird. Auf diese Weise wird die vollständige, kodierende mRNA durch Spleißen der pre-RNA des Gens am Integrationsort wieder generiert.

5

Nicht natürlicherweise in der plastidären DNA vorkommende DSB-Erkennungssequenzen können auf verschiedene Arten in die plastidäre DNA eingeführt werden. Beispielhaft seien zu nennen:

10 a) Integration mittels Doppel-Crossover

Bevorzugt wird die Integration in das Plastidengenom mit Hilfe der oben beschriebenen, dem Fachmann allgemein bekannten Verfahren (Doppel-Crossover) durchgeführt.

15

b) Integration unter Verwendung natürlicher, endogener DSB-Erkennungssequenzen

20 c) Integration unter Verwendung von Rekombinasen und entsprechenden Erkennungssequenzen.

Auch wenn der Aufwand zur Insertion einer künstlichen DSB-Erkennungssequenz in die plastidäre DNA relativ hoch ist und im Fall von a) dem der zur Zeit im Stand der Technik beschriebenen

25 Verfahren zur Plastidentransformation entspricht, so muss dieser Aufwand lediglich einmalig betrieben werden. Die erhaltene homotransplastome Masterpflanze kann dann für beliebig viele unterschiedliche nachfolgende Transformationen unter Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens eingesetzt werden, was eine erheb-

30 liche Steigerung der Transformationseffizienz ermöglicht: Statt den herkömmlichen Selektionsprozess für eine homotransplastome Pflanze jedes Mal vollständig durchlaufen zu müssen, muss er hier nur einmal realisiert werden.

35 "Deaktivierung der Funktionalität" einer DSB-Erkennungssequenz
meint, dass durch Insertion der Insertionssequenz an oder nahe
der Position des Doppelstrangbruches eine Zerstörung der DSB-
Erkennungssequenz erfolgt, d.h., dass das entsprechende DSBI-
Enzym die Region nicht mehr erkennt und dementsprechend dort
40 keinen Doppelstrangbruch mehr induziert.

Aufbau des Transformationskonstruktes mit der Insertionssequenz

Unter Verwendung einer der oben beschriebenen Masterpflanzen bzw. von diesen abgeleiteten Zellen, die eine natürliche und/oder eine künstlich-erzeugte DSB-Erkennungssequenz im Plastom enthalten, wird die Insertionssequenz in besagte DSB-Erkennungssequenz

40.

im Rahmen einer Transformation insertiert. Dies geschieht bei gleichzeitigem Vorhandensein eines DSB1-Enzyms, welches eine der DSB-Erkennungssequenzen im Plastom erkennt.

- 5 In seiner einfachsten Form besteht das Transformationskonstrukt allein aus der Insertionssequenz selber, beispielsweise aus einer Expressionskassette, die die Expression eines bestimmten Gens in den Plastiden gewährleisten soll. Die sequenzspezifische Induktion von Doppelstrangbrüchen ist ausreichend, um die
- 10 Platzierung dieser Insertionssequenz an dieser Position zu gewährleisten und so die Deaktivierung der DSB-Erkennungssequenz zu bewirken.

- In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Insertionssequenz mindestens eine zu exprimierende Nukleinsäuresequenz. Um die Expression (Transkription und/oder Translation) zu gewährleisten, sind diese - je nach Ausführungsform und Insertionsort - mit regulatorischen Elementen zu versehen. Erfolgt die Insertion in einen transkriptionell aktiven Locus so sind - wie oben be-
- 20 schrieben - keine Promotorsequenzen erforderlich. Vorteilhaft werden die zu exprimierenden Sequenzen in jedem Fall mit Ribosomenbindestellen in geeignetem Abstand stromaufwärts des offenen Leserahmens versehen oder besitzen bereits solche von Natur aus. Diese regulatorischen Sequenzen oder Teile derselben können aber
- 25 auch im Plastom natürlicherweise vorhanden sein oder bereits im ersten Schritt, d.h. bei der Generierung einer nicht-natürlichen Masterpflanze zusammen mit der der DSB-Erkennungssequenz in die plastidäre-DNA eingeführt werden.

- 30 Eine Steigerung der Insertionseffizienz und -genauigkeit kann dadurch bewirkt werden, dass die im Transformationskonstrukt enthaltene Insertionssequenz und die DSB-Erkennungssequenz von homologen Sequenzbereichen flankiert werden, die eine homologe Rekombination infolge des induzierten Doppelstrangbruchs
- 35 gewährleisten. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Insertionssequenz flankierende Homologiesequenzen A' bzw. B', wobei die in die plastidäre DNA einzufügende Sequenz zwischen A' und B' liegt. Die DSB-Erkennungssequenz wird von Homologiesequenzen A bzw. B flankiert, wobei die DSB-Erkennungssequenz
- 40 zwischen A und B liegt. A und B können natürlichen Ursprungs sein, oder im Rahmen der Insertion von nicht-natürlichen DSB-Erkennungssequenzen eingeführt worden sein. A und A' bzw. B und B' weisen eine ausreichende Länge und ausreichende Homologie zu einander auf, um eine homologe Rekombination zwischen A und A'
- 45 bzw. B und B' zu gewährleisten.

In einer weiteren Ausführungsform ist die DSB-Erkennungssequenz lediglich von einer Homologiesequenz A flankiert, die eine ausreichende Homologie zu einer die Insertionssequenz einseitig flankierenden Sequenz A' aufweist.

5

"Ausreichende Länge" meint in Bezug auf die Homologiesequenzen bevorzugt Sequenzen von einer Länge von mindestens 20 Basenpaaren, bevorzugt mindestens 50 Basenpaaren, besonders bevorzugt von mindestens 100 Basenpaaren, ganz besonders bevorzugt von
10 mindestens 250 Basenpaaren, am meistens bevorzugt von mindestens 500 Basenpaaren.

"Ausreichende Homologie" meint in Bezug auf die Homologiesequenzen A und A' bzw. B und B' bevorzugt Sequenzen die eine
15 Homologie innerhalb dieser Homologiesequenzen aufweisen von mindestens 70 %, bevorzugt 80 %, vorzugsweise mindestens 90 %, besonders bevorzugt mindestens 95 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 99 %, am meisten bevorzugt 100% über eine Länge von mindestens 20 Basenpaaren, bevorzugt mindestens 50 Basenpaaren,
20 besonders bevorzugt von mindestens 100 Basenpaaren, ganz besonders bevorzugt von mindestens 250 Basenpaaren, am meistens bevorzugt von mindestens 500 Basenpaaren.

Unter Homologie zwischen zwei Nukleinsäuren wird die Identität
25 der Nukleinsäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

30

Gap Weight: 12

Length Weight: 4

Average Match: 2,912

Average Mismatch:-2,003

35 Da die homologe Rekombination durch den induzierten Doppelstrangbruch gefördert wird, sind die Anforderungen an Länge und Homologie der Sequenzen deutlich geringer als beispielsweise bei einer konventionellen homologen Rekombination. Die homologen Bereiche können dabei auch deutlich kleiner als 250 bp sein. Die
40 Verwendung von Homologiesequenzen, hat den Vorteil, dass wenn A' und B' unterschiedlich sind, oder lediglich eine Homologiesequenz A' verwendet wird, eine gerichtete Insertion der Insertionssequenz in die plastidäre DNA erfolgen kann.

45 Bevorzugt umfasst das Transformationskonstrukt oder die Insertionssequenz einen Selektionsmarker, der eine Selektion transplastomer Plastiden ermöglicht (s.u.), besonders bevorzugt

aadA, BADH oder einen "binding type"-Marker. Der Selektionsmarker ist bevorzugt so konstruiert, dass eine nachfolgende Deletion aus dem Plastom ermöglicht wird. Entsprechende Verfahren sind dem Fachmann bekannt und unten beschrieben.

5

Die Insertionssequenz oder das Transformationskonstrukt hat bevorzugt die Struktur und Sequenz eines Introns. In der Regel werden dazu natürlicherweise vorkommende Introns so modifiziert, dass sie den Erfordernissen des erfindungsgemäßen Verfahrens
10 genügen. Derartige artifizielle Introns sind insbesondere bevorzugt, wenn die Insertion in eine transkriptionell aktive oder gar kodierende Region - beispielsweise unter Nutzung einer natürlichen, endogenen DSB-Erkennungssequenz - erfolgen soll. Bevorzugt erfolgt die Insertion derart, dass die insertierte Sequenz
15 durch Spleißen der pre-mRNA restlos entfernt wird. Die herausgespleißte RNA (also das artifizielle Intron) stellt dann die mRNA beispielsweise für die Translation auf ihr kodierter Proteine dar. Dieses Verfahren hat weitere Vorteile:

20 - Die genutzten Introns weisen eine ausgeprägte Sekundärfaltung auf, so dass sich eine relativ stabile RNA ergibt. Dadurch können die in dem Intron kodierten Gene von Interesse besonders hoch exprimiert werden, wie es beispielsweise in E. coli demonstriert wurde (Chan KYW et al. (1988) Gene
25 73:295-304).

- Wenn das Intron in ein Gen hinein integriert wird, unterliegt die Transkription des Introns der regulatorischen Kontrolle des Gens, in das das Intron integriert wurde. Daher kann
30 man sich alle regulatorischen Elemente stromaufwärts bzw. stromabwärts der Gene oder des Gens von Interesse in dem Intron sparen. Dadurch kann man die Konstrukte entsprechend klein halten und ist sicher, dass eine Transkription auch in der betrachteten Spezies tatsächlich funktioniert. Die
35 Nutzung heterologer regulatorischer Elemente beinhaltet ein Restrisiko, dass diese nicht in den betrachteten Plastiden der entsprechenden Pflanzenart funktionell sind. Die Nutzung homologer Sequenzen kann aufgrund der Sequenzduplikation zu spontanen Rekombinationsereignissen mit den endogenen
40 Sequenzen und so zu einer Instabilität des Organellgenoms führen. Durch die Möglichkeit auf das Einbringen regulatorischer Elemente weitgehend verzichten zu können - beispielsweise indem man das Gen von Interesse in einem Intron kodiert, welches in eine transkriptionell aktive Region
45 des Plastoms insertiert wird, können mit dem erfindungsgemäßen Verfahren in dieser Ausführungsform zusätzlich zur Steigerung der Insertions- und Verbreitungsfähigkeit des

Transformationskonstruktes viele weitere Nachteile der konventionellen Plastidentransformation umgangen werden.

Darüber hinaus sind alle Introns nutzbar, wenn man gleichzeitig
5 die entsprechenden Faktoren, die das Spleißen vermitteln, in den Plastiden exprimiert oder sie in diese importiert. Bevorzugt sind die das Spleißen unterstützenden Faktoren im Intron selbst kodiert. Besonders bevorzugt werden in dieser Ausführungsform Introns der Gruppe II, die selbst wenigstens einen der für das
10 Spleißen notwendigen Faktoren kodieren. Dazu gehört das Ll.ltrB Intron aus *Lactococcus*. Ebenfalls bevorzugt sind Introns, die natürlicherweise in Plastiden höherer Pflanzen vorkommen, besonders Introns der Gruppe II, ganz besonders bevorzugt Introns, die für ein Protein kodieren, am meisten bevorzugt
15 Introns der trnK Gene des Plastidengenoms. Im letzteren Fall sind besonders bevorzugt die Introns aus den trnK Genen der Plastiden aus den Arten *Arabidopsis*, Mais und Tabak.

Bevorzugt sind Introns mit einer selbst-spleißenden Aktivität,
20 die nicht von weiteren Proteinfaktoren abhängt, oder Introns, die allgemeine Faktoren zum Spleißen benutzen, die universell und damit auch in Plastiden vorhanden sind, sowie Introns, die selbst für Faktoren kodieren, die für das Spleißen notwendig sind.. Zu diesen Introns gehören beispielsweise

25

- a) das Intron der Gruppe I aus *Tetrahymena* (GenBank Acc.-No.: X54512; Kruger K et al. (1982) Cell 31:147-157; Roman J und Woodson SA (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:2134-2139)
- 30 b) das rII-Intron der Gruppe II aus *Scenedesmus obliquus* (GenBank Acc.-No.: X17375.2 Nukleotide 28831 bis 29438; Holländer V und Kück U (1999) Nucl Acids Res 27: 2339-2344; Herdenberger F et al. (1994) Nucl Acids Res 22: 2869-2875; Kück U et al. (1990) Nucl Acids Res 18:2691-2697).
- 35 c) das Ll.LtrB Intron (GenBank Acc.-No.: U50902 Nukleotide 2854 bis 5345)
- d) das trnK-Intron aus *Arabidopsis* (GenBank Acc.-No.: AP000423
40 Neukleotide komplementär 1752 bis 4310)
- e) das trnK-Intron aus Mais (GenBank Acc.-No.: X86563 Nukleotide komplementär 1421 bis 3909)
- 45 f) das trnK-Intron aus Tabak (GenBank Acc.-No.: Z00044 Nukleotide komplementär 1752 bis 4310)

Sowohl artfremde als auch natürlicherweise in den Plastiden der jeweiligen Pflanze vorkommende Introns können genutzt werden. Zur Vermeidung von durch Sequenzduplikation bedingte Instabilitäten sind artfremde Introns - beispielsweise artfremde trnK-Introns - bevorzugt. Natürlicherweise in den Plastiden der jeweiligen Pflanze vorkommende Introns werden in einer bevorzugten Ausführungsform so modifiziert, dass sie zwar ihre Funktion noch erfüllen können, die Sequenzhomologie jedoch geringer als 95 %, bevorzugt 80 %, besonders bevorzugt 70 % zu der Sequenz des Ausgangsintrons ist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform steht ein Faktor, welcher das Spleißen des betrachteten Intron bewirkt, in trans zur Verfügung, d.h. ist nicht in dem Intron selbst kodiert. Ist dieser Faktor nicht natürlicherweise in dem betrachteten Plastid vorhanden, sondern wird erst in dieses eingebracht, kann dies auf verschiedene dem Fachmann bekannte Arten erfolgen. Beispielsweise sei das Einbringen einer entsprechenden kodierenden und exprimierbaren Sequenz in das Plastom oder das Einbringen in die nukleäre DNA genannt, wobei in letzterem Fall der Faktor vorzugsweise an eine PLS fusioniert wird.

Besonders bevorzugt sind Introns, die natürlicherweise ein DSB-Enzym (insbesondere eine Homing Endonuklease kodieren). Besonders bevorzugt ist das Intron Cp.LSU2 aus *Chlamydomonas pallidostigmatica*, welches das Enzym I-CpaI codiert (Turmel M et al. (1995) Mol Biol Evol 12:533-545). Bevorzugt sind ferner die Introns der Gruppe II aus den Mitochondrien der Hefe.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Intronsequenz dem Insertionsort angepasst, so dass sie an diesem Locus spleißen können. Die Anpassung kann bei Gruppe I Introns die internal guide sequence (IGS) bzw. bei den Introns der Gruppe II die exon binding sequence (EBS) I oder/und II betreffen.

Im Fall des trnK Introns aus Mais ist zu beachten, dass das vom trnK Intron kodierte Protein, welches auch die Maturasefunktion umfasst, in seiner natürlich kodierten Form vermutlich nicht ohne Editierung funktionell ist. Es konnte gezeigt werden, dass eine Editierung (His420Tyr) der entsprechenden mRNA in Plastiden der Gerste erfolgt (Vogel J et al. (1997) J Mol Biol 270:179-187). Tyrosin an Position 420 des matK Proteins ist hoch konserviert. Auch bei den Monokotyledonen Reis und Mais wurde in der kodierenden DNA an entsprechender Position ein Kodon kodierend für His gefunden. Es ist daher davon auszugehen, dass - wie in Gerste - auch in diesen Pflanzen das matK Transkript editiert wird. Da jedoch gegebenenfalls andere Pflanzenarten diese Editierung der

45.

RNA nicht gewährleisten können, wird in einer bevorzugten Ausführungsform das matK Gen im trnK-Intron aus Mais bereits durch einen entsprechenden His/Tyr-Austausch auf DNA-Ebene modifiziert, so dass eine RNA-Editierung nicht mehr erforderlich ist. Beispielsweise kann die Sequenz CATTATCATAGTGGAT des Mais trnK Intron mutiert werden zu CATTATTATAGTGGAT.

- Die Spleißstelle wird im Fall von Gruppe I Introns bestimmt durch die Paarung der IGS mit dem 5' und/oder 3' zum Intron gelegenen Exon des entsprechenden Transkriptes (Lambowitz AM & Belfort M (1993) Annu Rev Biochem 62:587-622). Durch dem Fachmann bekannte Techniken wie PCR oder synthetisches Erstellen von Nukleotidsequenzen können die IGS beliebiger Gruppe I Introns entsprechend so angepasst werden, dass ein Spleißen an der vordefinierten Insertionsstelle innerhalb der DSB-Erkennungsregion erfolgt. Die veränderte IGS wird derart gestaltet, dass sie - zumindest teilweise - Basenpaarung mit den Sequenzen des Transkriptes 5' und 3' der Insertionsstelle eingehen kann. Bevorzugt wird das Intron CpLSU2 aus *C. pallidostigmatica* genutzt, welches für die Homing Endonuklease I-CpaI codiert. Wird dieses in Zusammenhang mit der Expression des DSB-I-Enzyms I-CpaI genutzt, wodurch es zu einer Insertion der zu transformierenden DNA in die 23SrDNA des Plastidengenoms höherer Pflanzen kommt, ist keine Anpassung des Introns notwendig. Die Insertion erfolgt an einen Locus im Plastidengenom höherer Pflanzen, der homolog zu dem ist, an dem sich das Intron natürlicherweise in *C. pallidostigmatica* befindet. Dieses Introns ist daher bereits derart gestaltet, dass Paarungen mit dem 5' und 3' Exon eingegangen werden können und korrektes Spleißen in dieser Nukleotidumgebung erfolgt. Bevorzugt wird ferner das Gruppe I Intron aus *Tetrahymena thermophila*. Dort unterbricht es als 413bp lange "Intervening Sequence" (IVS) die 26S rRNA codierende Region (Accession V01416 J01235 Nukleotide 53 bis 465). Die natürlicherweise zu findende IGS mit der Sequenz 5'-ggaggg-3' (Waring RB et al. 1985 Cell 40: 371-380; Been, MD & Cech, TR 1986 Cell 47: 207-216) kann durch den Fachmann bekannte Techniken an die neue Insertionsstelle angepasst werden. Wird beispielsweise eine Integration in die DSB-Erkennungsstelle des I-CpaI Enzyms an die mit ^ gekennzeichnete Stelle gewünscht (cggtcct^aaggtagcgaaattc), kann die mutierte, angepasste IGS beispielsweise folgende Sequenz besitzen: 5'-gggacc-3'.

- Bei Gruppe II Introns, die mobil sind, sind neben der Maturase häufig weitere Aktivitäten in dem Proteinanteil des Ribonukleoprotein-Komplexes kodiert. Diese sind für das beschriebene Verfahren jedoch nicht zwangsläufig notwendig und können daher deletiert werden. Sie werden sogar bevorzugt deletiert, da dadurch das entsprechende Konstrukt kleiner und leichter handhabbar

ist. Dem Fachmann sind verschiedene Möglichkeiten bekannt, wie die entsprechenden Aktivitäten aus dem Proteinanteil entfernt werden können. Dies kann zum Beispiel durch Erstellen eines synthetischen Gens, welches nur noch die gewünschten Bereiche 5 umfasst, oder durch geeignete PCR Methoden erfolgen.

Selbst-spleißende Introns der Gruppe II besitzen eine konservierte Struktur und bestehen im allgemeinen aus 6 verschiedenen Domänen. Domäne I beinhaltet die Exon-Bindestellen (EBS1 und 10 EBS2), die beim Spleißvorgang eine Interaktion mit dem 5' vom Intron gelegenen Exon eingehen. Darüber hinaus findet eine Interaktion zwischen der "δ Region" (unmittelbar 5' der EBS1 gelegen) und der "δ' Region" am 3' Exon statt (Lambowitz AM & Belfort M (1993) Annu Rev Biochem 62:587-622; Michel F & Ferat JL (1995) 15 Annu Rev Biochem 64:435-461). Diese Sequenzen können durch dem Fachmann bekannte Techniken wie synthetisches Erstellen der Introns oder geeignete PCR Methoden jeweils derart angepasst werden, dass eine korrekte Wahl der Spleißstellen an dem in der DSB-Erkennungsregion gewählten Insertionsort gewährleistet ist. 20 Dies geschieht, indem man die genannten Regionen so modifiziert, dass Basenpaarungen mit den entsprechenden Sequenzen stromaufwärts (intron binding sequences, IBS) und stromabwärts (δ') der künstlichen Insertionssequenz eingegangen werden können. Wählt man als Insertionsort (^) für das Ll.LtrB Intron in der I-CpaI 25 Erkennungsregion beispielsweise cggctcctaaggt^agcgaaattc, so kann die δ und EBS1 Region beispielsweise die Sequenz TCGCTACCTTAG (natürliche Sequenz: TTATGTTGTG), die EBS2 beispielsweise die Sequenz GACCG (natürliche Sequenz: ATGTG) annehmen. Wählt man das trnK Intron aus Arabidopsis thaliana, so kann die δ und EBS1 30 Region bei Annahme der gleichen Insertionsstelle wie für das Ll.LtrB Intron angegeben beispielsweise die Sequenz CGCTACCTTAGG (natürliche Sequenz: AATGTTAAAAA) annehmen.

Wenn es sich bei der DSB-Erkennungssequenz um eine natürliche, 35 endogene Erkennungssequenz einer Homing Endonuklease handelt, erfolgt die Insertion eines gewählten Introns bevorzugt an der Stelle der DSB-Erkennungsregion, an der auch natürlicherweise das Intron zugehörig zur betrachteten Homing Endonuklease zu finden ist.

40

Bevorzugt wird die künstliche Insertionsstelle eines Introns in der DSB-Erkennungsstelle derart ausgewählt, dass 5' und 3' des insertierten Intron möglichst viele Basen denen an der natürlichen Insertionsstelle des betrachteten Introns entsprechen 45 und die DSB-Erkennungssequenz nach der Insertion des Introns nicht mehr funktionell ist. Ganz besonders bevorzugt entspricht das jeweils unmittelbar stromaufwärts bzw. stromabwärts der

Insertionsstelle des Intron gelegene Nukleotid dem am natürlichen Insertionsort."

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Intron 5 von Homologiesequenzen flankiert, um eine gerichtete Insertion zu ermöglichen. Die Homologiesequenzen sind dabei - wie oben beschrieben - homolog zu den die DSB-Erkennungssequenz flankierenden Sequenzen und ermöglichen so eine exakte Insertion.

- 10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher DNA-Konstrukte umfassend mindestens eine Nukleinsäuresequenz sowie Intronsequenzelemente, die befähigt sind, in einer von besagtem DNA-Konstrukt abgeleiteten Ribonukleinsäuresequenz die Deletion des für besagte Nukleinsäuresequenz kodierenden Ribonukleinsäure-
- 15 refragmentes zu gewährleisten, wobei besagte die Nukleinsäuresequenz in Bezug auf besagte Intronsequenzelemente heterolog ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Nukleinsäuresequenz zumindest von einer Spleißakzeptorsequenz und einer Spleißdonorsequenz flankiert.

20

In einer weiteren Ausführungsform umfasst das DNA-Konstrukt am 5'- und 3'-Ende Sequenzen H1 bzw. H2, die eine ausreichende Länge und Homologie zu plastidären Sequenzen H1' bzw. H2' aufweisen, um

25 eine homologe Rekombination zwischen H1 und H1' bzw. H2 und H2' und damit eine Insertion der von H1 und H2 flankierten Sequenz in das Plastom zu gewährleisten.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft eine transgene

30 Plastiden-DNA umfassend mindestens eine Nukleinsäuresequenz sowie Intronsequenzelemente, die befähigt sind, in einer von besagter transgenen Plastiden-DNA abgeleiteten Ribonukleinsäuresequenz die Deletion des für besagte Nukleinsäuresequenz kodierenden Ribonukleinsäurefragmentes zu gewährleisten, wobei die besagte Nukleinsäuresequenz in Bezug auf besagte Intronsequenzelemente heterolog

35 ist. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Nukleinsäuresequenz zumindest von einer Spleißakzeptorsequenz und einer Spleißdonorsequenz flankiert.

40 Die Insertionssequenz oder das Transformationskonstrukt kann zum Aufbau eines Transformationsvektor in einen Standard-Vektor wie pBluescript oder pUC18 kloniert werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Insertionssequenz bzw. Transformationskonstrukt als lineares oder linearisiertes

45 DNA-Molekül appliziert.

Bevorzugt wird nur der Teil des Transformationsvektors appliziert, der die Insertionssequenz oder das Transformationskonstrukt mit ggf. Homologiesequenzen, Selektionsmarker und/oder die Expressionskassette für das DSBI-Enzym umfasst.

- 5 Wird ganz oder teilweise auf Homologiesequenzen verzichtet, so wird das linearisierte DNA Molekül bevorzugt durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen erhalten, die an einem oder beiden Enden einzelsträngige DNA-Überhänge generieren, die zu denen kompatibel sind, die das DSBI-Enzym in der plastidären DNA
10 erzeugt.

- Der Transformationsvektor kann in einer bevorzugten Ausführungsform Elemente (z.B. einen plastidären ORI *origin of replication*, Replikationsursprung) umfassen, die es ihm ermöglichen, vor
15 der Integration in die plastidäre DNA im Plastid autonom zu replizieren oder stabil als extrachromosomales DNA-Molekül in den Plastiden zu existieren. Entsprechende Verfahren sind dem Fachmann bekannt (US 5,693,507; US 5,932,479; WO 99/10513). Dieses Verfahren ist bevorzugt, da es die zur Integration im Plastid zur
20 Verfügung stehende Kopienzahl der Insertionssequenzen steigert.

- Eines der oben beschriebenen Konstrukte kann mit einem der beschriebenen Verfahren in die Plastiden einer entsprechenden Masterpflanze eingebracht werden. Bevorzugt sind Mikroinjektion
25 und besonders bevorzugt Partikelbeschuss.

Klonierungs-, Expressions-, Selektions- und Transformationsverfahren

- 30 "Expressionskassette" meint - zum Beispiel in Bezug auf die Expressionkassette für das DSBI-Enzym - solche Konstruktionen bei denen die zu exprimierende DNA in funktioneller Verknüpfung mit mindestens einem genetischen Kontrollelement steht, dass ihre Expression (d.h. Transkription und oder Translation) ermöglicht
35 oder reguliert. Dabei kann die Expression zum Beispiel stabil oder transient, konstitutiv oder induzierbar erfolgen. Für die Einführung stehen dem Fachmann verschiedene unten aufgeführte direkte (z.B. Transfektion, Partikelbeschuss, Mikroinjektion) oder indirekte Verfahren (z.B. Agrobakterieninfektion, Virus-
40 infektion) zur Verfügung, die weiter unten aufgeführt werden.

- Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man allgemein eine Anordnung in der eine genetische Kontrollsequenz ihre Funktion in Bezug auf eine Nukleinsäuresequenz - beispielsweise kodierend für
45 ein DSBI-Enzym - ausüben kann. Funktion kann dabei beispielsweise die Kontrolle der Expression d.h. Transkription und/oder Translation der Nukleinsäuresequenz - beispielsweise kodierend für

ein DSBI-Enzym - bedeuten. Kontrolle umfasst dabei beispielsweise die Initiierung, Steigerung, Steuerung oder Suppression der Expression d.h. Transkription und ggf. Translation. Die Steuerung wiederum kann beispielsweise gewebe- und oder zeitspezifisch erfolgen. Sie kann auch induzierbar zum Beispiel durch bestimmte Chemikalien, Stress, Pathogene etc. sein.

Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines Promoters, der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz - beispielsweise kodierend für ein DSBI-Enzym - und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der Nukleinsäuresequenz - beispielsweise kodierend für ein DSBI-Enzym - erfüllen kann. Dabei ist es nicht zwingend notwendig, dass die funktionelle Verknüpfung bereits auf den Transformationskonstrukten gegeben ist. Die funktionelle Verknüpfung kann sich auch in Folge der Insertion in die Kern- bzw. plastidäre DNA ergeben, wobei hier die regulativen Elemente bereits in der Kern- bzw. plastidäre DNA vorliegen. Die regulativen Elemente können diesbezüglich natürlicherweise vorliegen oder aber in einem vorgeschalteten Schritt - beispielsweise bei der Einführung einer künstlichen DSB-Erkennungssequenz - eingebracht werden.

Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz - beispielsweise kodierend für ein DSBI-Enzym - hinter eine als Promoter fungierende Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der Nukleinsäuresequenz - beispielsweise kodierend für ein DSBI-Enzym - geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

Dem Fachmann sind verschiedene Wege bekannt, um zu einem der erfindungsgemäßen Transformationskonstrukte, diese umfassen den Vektoren oder einer der Expressionskassetten zu gelangen. Die Herstellung kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor

Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel FM et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind. Bevorzugt ist die direkte Fusion einer als Promoter fungierenden Nukleinsäuresequenz mit einer zu exprimierenden Nukleotidsequenz - beispielsweise kodierend für ein DSBI-Enzym.

Der Begriff der "genetischen Kontrollsequenzen" ist breit zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen oder die Funktion einer Expressionskassette oder Transformationsvektors haben. Genetische Kontrollsequenzen gewährleisten die Transkription und gegebenenfalls Translation in Zellkern (bzw. Zytoplasma) oder Plastiden. Vorzugsweise umfassen die erfindungsgemäßen Expressionskassetten 5'-stromaufwärts von der jeweiligen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz als zusätzliche genetische Kontrollsequenz, sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils funktionell verknüpft mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.

Genetische Kontrollsequenzen sind beispielsweise beschrieben bei "Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)" oder "Gruber and Crosby, in: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, eds.: Glick and Thompson, Chapter 7, 89-108" sowie den dort aufgewiesenen Zitaten.

Beispiele für derartige Kontrollsequenzen sind Sequenzen, an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Kontrollsequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Die Expressionskassette kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt, es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die vorstehend erwähnten Gene inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Stattdessen wird die natürliche Kontrollsequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können auch allein vor die natürlichen Gene zur Steigerung der Aktivität gebracht werden.

Je nach nachstehend näher beschriebenen Wirtsorganismus oder Ausgangsorganismus, der durch Einbringen der Expressionskassetten oder Vektoren in einen genetisch veränderten oder transgenen Organismus überführt wird, eignen sich verschiedene Kontrollsequenzen.

Zur nukleären Expression (beispielsweise einer viralen/Bakteriophagen RNA-Polymerase oder eines DSBI-Enzyms mit einem plastidären Transitpeptid) sind grundsätzlich alle Promotoren geeignet, der die Expression von Genen, insbesondere Fremdgenen, in Pflanzen steuern können.

Geeignet sind Promotoren, die eine konstitutive Expression in Pflanzen ermöglichen (Benfey et al. (1989) EMBO J. 8:2195-2202).

15 Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Besonders bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. 1986, Plant Mol. Biol. 6, 221-228) oder den 19S CaMV Promotor (US 5,352,605 and WO 84/02913). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer weitgehend permanenten und konstitiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028). Ein weiteres Beispiel eines geeigneten Promotors ist der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-No.: X03677). Weitere bevorzugte konstitutive Promotoren sind zum Beispiel der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobakterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobakterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten, der FBPaseP Promotor (WO 98/18940) oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991). Weiterhin geeignete und im Rahmen dieser Erfindung bevorzugte konstitutive Promotoren sind der SuperPromotor (Ni M et al. (1995) Plant J 7:661-676; US 5,955,646) sowie der Nitrilase-1 Promotor des nit1 Gens aus Arabidopsis (GenBank Acc.-No.: Y07648.2, Nukleotide 2456 bis 4340; Hillebrand H et al. (1998) Plant Mol Biol 36 (1):89-99; Hillebrand H et al. (1996) Gene 170(2):197-200).

Bevorzugt sind induzierbare, besonders bevorzugt chemisch induzierbare Promotoren (Aoyama T und Chua NH (1997) Plant J 11:605-612; Caddick MX et al. (1998) Nat. Biotechnol 16:177-180; Review: Gatz (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol

- 48:89-108), durch die die Expression zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Beispielfhaft seien zu nennen der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein
 5 durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP-A-0388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisisäure-induzierbarer Promotor (EP-A 335 528), ein durch Ethanol induzierbarer Promotor (Salter MG et al. (1998) Plant J. 16:127-132), der schwermetall-
 10 induzierbarer Metallothionein I Promotor (Amini S et al. (1986) Mol Cell Biol 6:2305-2316), der steroid-induzierbarer MMTV LTR Promotor (Izant JG et al. (1985) Science 229:345-352) sowie ein durch Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334). Besonders bevorzugt ist die induzierbare Expression eines PLS/
 15 DSBI-Enzym-Fusionsproteins im Kern. Induzierbare Promotoren umfasst auch solche, die durch bestimmte Repressorproteine (z.B. tet, lac) reguliert werden können. Entsprechende Repressorproteine können in Fusion mit PLS in die Plastiden translokalisiert werden und dort die Expression bestimmter Gene unter Kontrolle
 20 entsprechender Promotoren regulieren. Der Repressor bindet in den Plastiden an eine künstliche ins Plastom eingefügte Repressorbindestelle und kann so die Expression des stromabwärts gelegenen Gens unterdrücken (vgl. WO95/25787). Dadurch kann beispielsweise die Expression eines plastidkodierten DSBI-Enzym im Bedarfsfall
 25 induziert oder sie bis auf den Moment, in dem die Expression gewünscht ist, unterdrückt werden.

- Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der
 30 pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al., Plant Mol Biol 1993, 22: 361-366), der hitzeinduzierbare hsp70-Promotor oder der hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kalteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814) oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter
 35 (EP-A 0 375 091).

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird vor allem die für das DSBI-Enzym kodierende Nukleinsäure unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors exprimiert. Damit wird eine
 40 kontrollierte, steuerbare Expression erreicht und etwaige Probleme durch eine konstitutive Expression eines DSBI-Enzyms vermieden.

- Vorteilhafte Kontrollsequenzen für die erfindungsgemäßen
 45 Expressionskassetten oder Vektoren umfassen virale, bakteriophage oder bakterielle Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, phoA-, tat-, lpp-, lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-,

53

λ -PR- oder im λ -PL-Promotor. Diese werden bevorzugt in Kombination mit der Expression der jeweils korrespondierenden RNA-Polymerase eingesetzt.

- 5 Die Expression in Plastiden kann unter Verwendung plastidärer Promotoren und/oder Transkriptionsregulations-elemente realisiert werden. Beispielfhaft jedoch nicht einschränkend seien zu nennen der RNA-Polymerase Promotor (WO 97/06250) oder die in WO 00/07431, US 5,877,402, WO 97/06250, WO 98/5559,5 WO 99/46394, 10 WO 01/42441 und WO 01/07590 beschriebenen Promotoren. Zu nennen sind das rpo B Promotorelement, das atpB Promotorelement, das clpP Promotorelement (siehe auch WO 99/46394) oder das 16S-rDNA Promotorelement. Dabei kann dem Promotor auch ein polycistronisches "Operon" zugeordnet sein (EP-A 1 076 095; 15 WO 00/20611). Beschrieben sind auch Systeme bei denen eine nicht-pflanzliche (z.B. virale) RNA-Polymerase unter Verwendung plastidärer Transitpeptide in das Plastid importiert wird und dort spezifisch die Expression transgener Sequenzen induziert, die unter Kontrolle der Erkennungssequenzen der RNA-Polymerase 20 stehen und zuvor in die plastidäre DNA inseriert wurden (WO 95/16783; US 5,925,806; US 5,575,198).

Neben den genannten Promotoren wären weiter bevorzugt zu verwenden:

- 25 a) der PrbcL Promotor (SEQ ID NO: 44)
b) der Prps16 Promotor (SEQ ID NO: 50)
30 c) der Prrn16 Promotor (SEQ ID NO: 46)

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden NEP Promotoren eingesetzt. Dies sind Promotoren, die in Plastiden funktionell sind und von der nukleär kodierten, plastidären 35 RNA-Polymerasen (NEP) erkannt werden. Bevorzugt sind: Prrn-62; Pycf2-1577; PatpB-289; Prps2-152; Prps16-107; Pycf1-41; PatpI-207; PclpP-511; PclpP-173 und PaccD-129 (WO 97/06250; Hajdukiewicz PTJ et al (1997) EMBO J 16:4041-4048).

40 Besonders bevorzugt sind:

- a) Der PaccD-129 Promotor des accD Gens aus Tabak (WO 97/06250; SEQ ID NO: 47)
45 b) Der PclpP-53 Promotor des clpP Gens als hoch-aktiver NEP Promotor in Chloroplasten (WO 97/06250; SEQ ID NO: 48)

- c) Der Prn-62 Promotor des rrn Gens (SEQ ID NO: 49)
- d) Der Prps16-107 Promotor des rps16 Gens (SEQ ID NO: 45):
- 5 e) Der PatpB/E-290 Promotor des atpB/E Gens aus Tabak (Kapoor S et al. (1997) Plant J 11:327-337) (SEQ ID NO: 51)
- f) Der PrpoB-345 Promotor des rpoB Gens (Liere K & Maliga P (1999) EMBO J 18: 249-257) (SEQ ID NO: 52)

10

Im Allgemeinen sind in dieser bevorzugten Ausführungsform alle Promotoren nutzbar, die der Klasse III angehören (Hajdukiewicz PTJ et al (1997) EMBO J 16:4041-4048) sowie alle Fragmente der Promotoren der Klasse II, die die Transkriptionsinitiation durch
 15 die NEP steuern. Solche Promotoren bzw. Promotor-Anteile sind nicht besonders hoch konserviert. Als Consensus nahe der Transkriptionsinitiationsstelle von NEP Promotoren wird angegeben: ATAGAATAAAA (Hajdukiewicz PTJ et al (1997) EMBO J 16:4041-4048).

- 20 Normalerweise werden Gene von regulatorischen Sequenzen umgeben, die aus den Plastiden des zu transformierenden Organismus stammen. Dadurch erzeugt man Sequenzduplikationen, die zu Instabilitäten aufgrund von spontanen, intrachromosomalen homologen Rekombinationsereignissen führen können (Heifetz PB (2000) Bio-
 25 chimie 82(6-7):655-666). Es wurde zur Lösung dieses Problems vorgeschlagen, heterologe regulatorische Sequenzen zu nutzen, oder endogen im Plastidengenom bereits vorhandene regulatorische Einheiten auszunutzen (WO 99/46394; WO 01/42441). Auch eine Verminderung der Homologie durch Mutagenese der endogenen Promotor-
 30 sequenz ist beschrieben (WO 01/07590).

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden. Besonders bevorzugt sind Pro-
 35 motoren isoliert aus Prokaryoten. Ganz besonders bevorzugt sind Promotoren isoliert aus Synechocystis oder E.coli. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden, wie beispielsweise ein synthetischer Promotor abgeleitet von der E. coli Konsensus Sequenz für $\sigma 70$ Promotoren:

40

5'-TTGACA N₁₆₋₁₉ TATAAT N₃ CAT -3',

- wobei N für jedes beliebige Nukleotid (also A, G, C oder T) steht. Dem Fachmann ist offensichtlich, dass auch einzelne bis
 45 wenige Basenaustausche in den angegebenen, konservierten Regionen möglich sind, ohne die Funktion des Promotors zu zerstören. Die variable Gestaltung dieser synthetischen Promotoren durch Nutzen

verschiedener Sequenzabfolgen, ermöglicht es, eine Vielzahl von Promotoren zu erstellen, die nicht extensive Homologien aufweisen, was insbesondere für den Fall, dass mehrere Promotoren benötigt werden, die Stabilität der Expressionskassetten im Plastom erhöht. Beispielfhaft aber nicht einschränkend seien nachfolgende besonders bevorzugte Promotorsequenzen genannt, die von oben genannter Konsensussequenz abgeleitet sind:

- a) 5'-TTGACATTCACCTCTTCAATTATCTATAATGATACA-3' (SEQ ID NO: 53)
10 b) 5'-TTGACAATTTTCCTCTGAATTATATAATTAACAT-3' (SEQ ID NO: 72)

Dem Fachmann ist offensichtlich, daß diese synthetischen Promotoren die Expression beliebiger Gene steuern können. Sie können beispielsweise dazu genutzt werden, die Expression eines Selektionsmarkers anzutreiben - auch, um unter regenerativen Bedingungen auf transplastome Pflanzen unter Zuhilfenahme von besagtem Selektionssystem selektieren zu können. Selektionsmarker sind weiter unten beispielhaft aufgezählt. Darüber hinaus können solche synthetischen Promotoren mit jedem beliebigen Gen verknüpft werden, beispielsweise mit Genen kodierend für Antikörper, Antigene oder Enzyme. Bevorzugt enthalten die Expressionskassetten bestehend aus solchen Promotoren auch im folgenden näher beschriebene 5'-untranslatierte Regionen (oder Ribosomenbindestellen) oder 3'-nichtkodierende Regionen.

25 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Expressionskassetten enthaltend eine für ein DSB1-Enzym kodierende Nukleinsäuresequenz unter Kontrolle eines in pflanzlichen Plastiden funktionellen Promotors, beispielsweise eines der oben beschriebenen Promotoren. Die Expressionskassette kann weitere Elemente, wie beispielsweise Transkriptionsterminatoren und/oder Selektionsmarker beinhalten.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressionssteuernden Eigenschaften modifizieren können. Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) oder die nichtkodierende 3'-Region (3'-UTR) von Genen (Eibl C (1999) Plant J 19: 1-13). Es ist gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktionen bei der Regulation der Genexpression in Plastiden höherer Pflanzen spielen können. Auch im Kern können genetische Kontrollelemente wie 5'-UTR, Introns oder 3'UTR eine Funktion bei der Genexpression besitzen. So wurde beispielsweise gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Sie können

56

ferner die Gewebespezifität fördern (Rouster J et al., Plant J, 1998, 15: 435-440.).

Bevorzugt werden als 5' UTRs und 3'UTRs in Plastiden eingesetzt:

- 5 a) 5'psbA (aus Tabak) (SEQ ID NO: 54)
- b) 5'rbcl einschließlich 5' Anteilen aus dem codierenden Bereich des rbcl Gens (aus Tabak) (SEQ ID NO: 55); die mit
10 SEQ ID NO: 55 beschriebene Sequenz wurden gegenüber der nativen Sequenz mutiert, um eine PstI bzw. NcoI Schnittstelle einzubringen.
- c) 5'rbcl's (SEQ ID NO: 56); die mit SEQ ID NO: 56 beschriebene
15 Sequenz wurden gegenüber der nativen Sequenz mutiert, um eine PstI Schnittstelle einzubringen.
- d) 3'psbA-1 aus Synechocystis (SEQ ID NO: 57)
- 20 e) 3'psbA aus Tabak (SEQ ID NO: 58)
- f) 3'rbcl aus Tabak (SEQ ID NO: 59)

Genetische Kontrollsequenzen vor allem für die Expression in
25 Plastiden umfassen insbesondere auch Ribosomenbindungssequenzen zur Initiation der Translation. Diese sind für gewöhnlich in den 5'UTRs enthalten. Dies ist vor allem dann bevorzugt, wenn von der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz entsprechende Sequenzen nicht bereitgestellt werden oder diese mit dem Expressions-
30 system kompatibel sind. Insbesondere bevorzugt ist die Verwendung einer synthetischen Ribosomenbindestelle (RBS) mit der Sequenz 5'-GGAGG(N)₃₋₁₀ATG-3', bevorzugt 5'-GGAGG(N)₅ATG-3' (SEQ ID NO: 60) besonders bevorzugt 5'-GGAGGATCTCATG-3' (SEQ ID NO: 61).

35 Die Expressionskassette kann vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte transgene Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der transgen zu
40 exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen insertiert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Ferner ist es möglich, nach dem Startcodon eine sogenannte Downstream-Box einzufügen, die die Expression im Allgemeinen steigert (Translations-"Enhancer". WO 00/07431; WO 01/21782).

- 5 Als genetische Kontrollsequenzen v.a. bei der Kerntransformation geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids
- 10 pTiACHS entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente davon. Beispiele für besonders geeignete Terminatorsequenzen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopalinsynthase)-Terminator.
- 15 Die erfindungsgemäßen Transformationsvektoren und Insertionssequenzen können weitere Nukleinsäuresequenzen umfassen. Solche Nukleinsäuresequenzen können bevorzugt Expressionskassetten darstellen. Beispielhaft aber nicht einschränkend für die in den Expressionskonstrukten zu exprimierenden DNA-Sequenzen
- 20 seien zu nennen:

1. Selektionsmarker

- "Selektionsmarker" meint all solche Nukleinsäure- oder Proteinsequenzen, deren Expression (d.h. Transkription und ggf. Translation) einer Zelle, Gewebe oder Organismus einen anderen Phänotyp verleiht, als einer nicht transformierten. Selektionsmarker umfasst beispielsweise solche Nukleinsäure- oder Proteinsequenzen, deren Expression einer Zelle, Gewebe oder Organismus
- 30 einen Vorteil (positiver Selektionsmarker) oder Nachteil (negativer Selektionsmarker) gegenüber Zellen vermittelt, die diese Nukleinsäure oder Protein nicht exprimieren. Positive Selektionsmarker wirken beispielsweise dadurch, dass eine auf die Zelle inhibitorisch wirkende Substanz detoxifiziert wird (Bsp.
- 35 Antibiotika-/Herbizidresistenz), oder eine Substanz gebildet wird, welche der Pflanze unter den gewählten Bedingungen verbesserte Regeneration oder erhöhtes Wachstum ermöglicht (zum Beispiel nutritive Marker, hormonproduzierender Marker wie ipt; s.u.). Eine andere Form positiver Selektionsmarker umfasst
- 40 mutierte Proteine oder RNAs, die gegenüber einem selektiven Agens nicht empfindlich sind (beispielsweise 16S rRNA Mutanten, die unempfindlich gegenüber Spectinomycin sind). Negative Selektionsmarker wirken beispielsweise dadurch, dass sie die Bildung einer toxischen Substanz in den transformierten Zellen katalysieren
- 45 (zum Beispiel das codA Gen). Ferner kann Selektionsmarker auch Reporterproteine umfassen, insofern diese geeignet sind, transformierte von nicht-transformierten Zellen, Geweben oder Organen

(beispielsweise durch Farbgebung oder einen anderen detektierbaren Phänotyp) zu unterscheiden.

Nachfolgende Selektionsmarker seien beispielhaft und nicht einschränkend zu nennen:

1.1 Positive Selektionsmarker:

Der mit der Expressionskassette in den Zellkern oder die Plastiden eingebrachte selektionierbare Marker verleiht den erfolgreich transformierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herbizid wie Phosphinothricin, Glyphosat oder Bromoxynil), einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum, wie zum Beispiel Tetracycline, Ampicillin, Kanamycin, G'418, Neomycin, Bleomycin oder Hygromycin. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al., Plant Cell Reports 5 (1986), 81-84; Dix PJ & Kavanagh TA (1995) Euphytica 85: 29-34).

Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche, die eine Resistenz gegen Herbizide verleihen. Beispielhaft als Selektionsmarker seien genannt:

- 25 - DNA Sequenzen, die für Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT) kodieren, welche die freie Aminogruppe des Glutaminsynthaseinhibitors Phosphinothricin (PPT) acetylieren und damit eine Detoxifizierung des PPT erreichen (de Block et al. 1987, EMBO J. 6, 2513-2518) (auch Bialaphos® resistenzgen (bar) genannt). Das bar Gen kodierend für eine Phosphinothricinacetyltransferase (PAT) kann aus beispielsweise Streptomyces hygroscopicus oder S. viridochromogenes isoliert werden. Entsprechende Sequenzen sind dem Fachmann bekannt (aus Streptomyces hygroscopicus GenBank Acc.-No.: X17220 und X05822, aus Streptomyces viridochromogenes GenBank Acc.-No.: M 22827 und X65195; US 5,489,520). Ferner sind synthetische Gene beispielsweise für die Expression in Plastiden beschrieben. Ein synthetisches Pat Gen ist beschrieben in Becker et al. (1994) The Plant J. 5:299-307.
- 30 - Die Gene verleihen Resistenz gegen das Herbizid Bialaphos oder Glufosinat und sind vielbenutzter Marker in transgenen Pflanzen (Vickers JE et al. (1996). Plant Mol Biol Reporter 14:363-368; Thompson CJ et al. (1987) EMBO J 6:2519-2523).
- 35 - 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen. Das unselektive Herbizid Glyphosat

- hat die 5-Enolpyruvyl-3-phosphoshikimatsynthase (EPSPS) als molekulares Target. Diese hat eine Schlüsselfunktion in der Biosynthese aromatischer Aminosäuren in Mikroben und Pflanzen, jedoch nicht in Säugern (Steinrucken HC et al. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 94:1207-1212; Levin JG und Sprinson DB (1964) J. Biol. Chem. 239: 1142-1150; Cole DJ (1985) Mode of action of glyphosate a literature analysis, p. 48-74. In: Grossbard E und Atkinson D (eds.). The herbicide glyphosate. Butterworths, Boston.). Glyphosat-tolerante EPSPS Varianten werden bevorzugt als Selektionsmarker verwendet (Padgett SR et al. (1996). New weed control opportunities: development of soybeans with a Roundup Ready™ gene. In: Herbicide Resistant Crops (Duke, S.O., ed.), pp. 53-84. CRC Press, Boca Raton, FL; Saroha MK und Malik VS (1998) J Plant Biochemistry and Biotechnology 7:65-72). Das EPSPS Gen des Agrobakterium sp. strain CP4 hat eine natürliche Toleranz gegen Glyphosat, die auf entsprechende transgene Pflanzen transferiert werden kann. Das CP4 EPSPS Gen wurde aus Agrobakterium sp. strain CP4 kloniert (Padgett SR et al. (1995) Crop Science 35(5):1451-1461). Sequenzen von 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate-synthasen, die Glyphosat-tolerant sind, wie beispielsweise beschrieben in US 5,510,471; US 5,776,760; US 5,864,425; US 5,633,435; US 5,627,061; US 5,463,175; EP 0 218 571, sind sowohl in den Patenten beschrieben als auch in der GenBank hinterlegt. Weitere Sequenzen sind beschrieben unter GenBank Accession X63374. Ferner ist das aroA Gen bevorzugt (M10947 S. typhimurium aroA locus 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (aroA protein) gene).
- das für das Glyphosat® degradierende Enzyme kodierende gox Gen (Glyphosatoxidoreduktase). GOX (beispielsweise die Glyphosatoxidoreduktase aus Achromobacter sp.) katalysiert die Spaltung einer C-N Bindung im Glyphosat, welches so zu Aminomethylphosphonsäure (AMPA) und Glyoxylat umgesetzt wird. GOX kann dadurch eine Resistenz gegen Glyphosat vermitteln (Padgett SR et al. (1996) J Nutr. 1996 Mar;126(3):702-16; Shah D et al. (1986) Science 233: 478-481).
- das deh Gen (kodierend für eine Dehalogenase, die Dalapon® inaktiviert), (GenBank Acc.-No.: AX022822, AX022820 sowie WO99/27116)
- bxn Gene, die für Bromoxynil degradierende Nitrilaseenzyme kodieren. Beispielsweise die Nitrilase aus Klebsiella ozanenae. Sequenzen sind in der Genbank beispielsweise unter den Acc.-No: E01313 (DNA encoding bromoxynil specific

nitrilase) und J03196 (*K. pneumoniae* bromoxynil-specific nitrilase (bxn) gene, complete cds) zu finden.

- Neomycinphosphotransferasen verleihen eine Resistenz gegen Antibiotika (Aminoglykoside) wie Neomycin, G418, Hygromycin, Paromomycin oder Kanamycin, indem sie durch eine Phosphorylierungsreaktion deren inhibierende Wirkung reduzieren. Besonders bevorzugt ist das nptII Gen. Sequenzen können aus der GenBank erhalten werden (AF080390 Mini-transposon mTn5-GNm; AF080389 Minitransposon mTn5-Nm, complete sequence). Zudem ist das Gen bereits Bestandteil zahlreicher Expressionsvektoren und kann unter Verwendung von dem Fachmann geläufigen Verfahren (wie beispielsweise Polymerasekettenreaktion) aus diesen isoliert werden (AF234316 pCAMBIA-2301; AF234315 pCAMBIA-2300, AF234314 pCAMBIA-2201). Das NPTII Gen kodiert für eine Aminoglycosid-3'-O-phosphotransferase aus *E. coli*, Tn5 (GenBank Acc.-No: U00004 Position 1401-2300; Beck et al. (1982) Gene 19 327-336). Darüber hinaus kann auch das aphA-6 Gen aus *Acinetobacter baumannii*, kodierend für eine Aminoglykosidphosphotransferase, als Selektionsmarker genutzt werden (Huang et al. (2002) Mol Genet Genomics 268:19-27)
- das DOGR¹-Gen. Das Gen DOGR¹ wurde aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert (EP 0 807 836). Es codiert für eine 2-Desoxyglukose-6-phosphat Phosphatase, die Resistenz gegenüber 2-DOG verleiht (Randez-Gil et al. 1995, Yeast 11, 1233-1240; Sanz et al. (1994) Yeast 10:1195- 1202, Sequenz: GenBank Acc.-No.: NC001140 chromosom VIII, *Saccharomyces cervisiae* Position 194799-194056).
- Sulfonylurea- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactat-synthasen, die eine Resistenz gegen Imidazolinon/Sulfonylurea-Herbizide verleihen. Beispielhaft seien für Imidazolinon-Herbizide die Wirkstoffe Imazamethabenz-methyl, Imazamox, Imazapyr, Imazaquin, Imazethapyr zu nennen. Für Sulfonylharnstoff-Herbizide seien beispielhaft Amidosulfuron, Azimsulfuron, Chlorimuronethyl, Chlorsulfuron, Cinosulfuron, Imazosulfuron, Oxasulfuron, Prosulfuron, Rimsulfuron, Sulfosulfuron zu nennen. Dem Fachmann sind zahlreiche weitere Wirkstoffe der genannten Klassen bekannt. Geeignet sind Nukleinsäuresequenzen wie beispielsweise die unter der GenBank Acc.-No.: X51514 abgelegte Sequenz für das *Arabidopsis thaliana* Csr 1.2 Gen (EC 4.1.3.18) (Sathasivan K et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18(8):2188). Acetolactatesynthasen,

61

die eine Resistenz gegen Imidazolinon-Herbizide verleihen, sind ferner beschrieben unter den GenBank Acc.-No.:

- 5 a) AB049823 *Oryza sativa* ALS mRNA for acetolactate synthase, complete cds, herbicide resistant biotype
- b) AF094326 *Bassia scoparia* herbicide resistant acetolactate synthase precursor (ALS) gene, complete cds
- 10 c) X07645 Tobacco acetolactate synthase gene, ALS SuRB (EC 4.1.3.18)
- d) X07644 Tobacco acetolactate synthase gene, ALS SuRA (EC 4.1.3.18)
- 15 e) A19547 Synthetic nucleotide mutant acetolactate synthase
- f) A19546 Synthetic nucleotide mutant acetolactate synthase
- 20 g) A19545 Synthetic nucleotide mutant acetolactate synthase
- h) I05376 Sequence 5 from Patent EP 0257993
- i) I05373 Sequence 2 from Patent EP 0257993
- 25 j) AL133315

- Hygromycinphosphotransferasen (X74325 *P. pseudomallei* gene for hygromycin phosphotransferase) die eine Resistenz gegen
30 das Antibiotikum Hygromycin verleihen. Das Gen ist Bestandteil zahlreicher Expressionsvektoren und kann unter Verwendung von dem Fachmann geläufigen Verfahren (wie beispielsweise Polymerasekettenreaktion) aus diesen isoliert werden
(AF294981 pINDEX4; AF234301 pCAMBIA-1380; AF234300 pCAM-
35 BIA-1304; AF234299 pCAMBIA-1303; AF234298 pCAMBIA-1302; AF354046 pCAMBIA-1305.; AF354045 pCAMBIA-1305.1)

- Resistenzgene gegen

- 40 a) Chloramphenicol (Chloramphenicolacetyltransferase),
- b) Tetracyclin, verschiedene Resistenzgene sind beschrieben z.B. X65876 *S. ordonez* genes class D tetA and tetR for tetracycline resistance and repressor proteins
- 45 X51366 *Bacillus cereus* plasmid pBC16 tetracycline resistance gene. Zudem ist das Gen bereits Bestandteil zahlreicher Expressionsvektoren und kann unter Verwendung

von dem Fachmann geläufigen Verfahren (wie beispielsweise Polymerasekettenreaktion) aus diesen isoliert werden

- 5 c) Streptomycin, verschiedene Resistenzgene sind beschrieben z.B. mit der GenBank Acc.-No.: AJ278607 *Corynebacterium acetoacidophilum* ant gene for streptomycin adenylyl-transferase.
- 10 d) Zeocin, das entsprechende Resistenzgen ist Bestandteil zahlreicher Klonierungsvektoren (z.B. L36849 Cloning vector pZEO) und kann unter Verwendung von dem Fachmann geläufigen Verfahren (wie beispielsweise Polymerasekettenreaktion) aus diesen isoliert werden.
- 15 e) Ampicillin (β -Lactamase Gen; Datta N, Richmond MH. (1966) *Biochem J.* 98(1):204-9; Heffron F et al (1975) *J. Bacteriol* 122: 250-256; das Amp Gen wurde zuerst zur Herstellung des *E. coli* Vektors pBR322 kloniert; Bolivar F et al. (1977) *Gene* 2:95-114). Die Sequenz ist Bestand-
- 20 teil zahlreicher Klonierungsvektoren und kann unter Verwendung von dem Fachmann geläufigen Verfahren (wie beispielsweise Polymerasekettenreaktion) aus diesen isoliert werden.
- 25 - Gene wie die Isopentenyltransferase aus *Agrobacterium tumefaciens* (strain:PO22) (Genbank Acc.-No.: AB025109). Das *ipt* Gen ist ein Schlüsselenzym der Cytokinin-Biosynthese. Seine Überexpression erleichtert die Regeneration von Pflanzen (z.B. Selektion auf Cytokinin-freiem Medium). Das
- 30 Verfahren zur Nutzung des *ipt* Gens ist beschrieben (Ebinuma H et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2117-2121; Ebinuma, H et al. (2000) Selection of Marker-free transgenic plants using the oncogenes (*ipt*, *rol A*, *B*, *C*) of *Agrobacterium* as selectable markers, In *Molecular Biology of Woody Plants*. Kluwer Academic Publishers).
- 35

Verschiedene weitere positive Selektionsmarker, die den transformierten Pflanzen einen Wachstumsvorteil gegenüber nicht-transformierten verleihen, sowie Verfahren zu ihrer Verwendung sind

40 u.a. beschrieben in EP-A 0 601 092. Beispielhaft sind zu nennen β -Glucuronidase (in Verbindung mit z.B. Cytokininglucuronid), Mannose-6-phosphat-Isomerase (in Verbindung mit Mannose), UDP-Galaktose-4-Epimerase (in Verbindung mit z.B. Galactose), wobei Mannose-6-phosphat-Isomerase in Verbindung mit Mannose besonders

45 bevorzugt ist.

Für einen in Plastiden funktionellen Selektionsmarker sind insbesondere solche bevorzugt, die eine Resistenz gegen Spectinomycin, Streptomycin, Kanamycin, Lincomycin, Gentamycin, Hygromycin, Methotrexat, Bleomycin, Phleomycin, Blasticidin, Sulfonamid, Phosphinotricin, Chlorsulfuron, Bromoxymil, Glyphosat, 2,4-Datrazin, 4-methyltryptophan, Nitrat, S-aminoethyl-L-cysteine, Lysin/Threonin, Aminoethyl-Cystein oder Betainaldehyd verleihen. Besonders bevorzugt sind die Gene *aadA*, *nptII*, *BADH*, *FLARE-S* (eine Fusion aus *aadA* und GFP, beschrieben bei Khan MS & Maliga P, 1999 Nature Biotech 17: 910-915).

Als in Plastiden funktionelle Selektionsmarker ist vor allem das *aadA* Gen beschrieben (Svab Z und Maliga P (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90:913-917). Ferner beschrieben sind modifizierte 16S rDNA, das *nptII* Gen (Kanamycinresistenz) und das *bar* Gen (Phosphinotricinresistenz). Aufgrund der Bevorzugung des Selektionsmarker *aadA* wird dieser bevorzugt "recycled" d.h. nach seiner Verwendung aus dem Genom bzw. Plastom deletiert (Fischer N et al. (1996) Mol Gen Genet 251:373-380; Corneille S et al. (2001) Plant J 27:171-178), so dass *aadA* in weiteren Transformationen einer bereits transplastomen Pflanze wieder als Selektionsmarker benutzt werden kann. Als weiterer möglicher Selektionsmarker ist die Betaine-aldehyd-Dehydrogenase (*BADH*) aus Spinat beschrieben (Daniell H et al. (2001) Trends Plant Science 6:237-239; Daniell H et al. (2001) Curr Genet 39:109-116; WO 01/64023; WO 01/64024; WO 01/64850). Auch lethal wirkende Agenzen wie beispielsweise Glyphosat können in Verbindung mit entsprechend detoxifizierenden oder resistenten Enzymen genutzt werden (WO 01/81605).

Es können auch *binding type marker* genutzt werden. Die Nutzen der als Insertionsstelle bevorzugten DBS-Erkennungssequenz der Homing-Endonuklease I-CpaI im Gen der 23S rRNA, wird wenigstens das 3'-Ende der Insertionssequenz (bevorzugt eines artifiziellen Introns) mit homologen Sequenzen der Zielregion umgeben. Es werden also Sequenzen der 23SrDNA in den Transformationsvektor aufgenommen. An einer Stelle (Position 2073 oder 2074 der 23SrRNA aus Tabak, Sequenz: AAAGACCCTATGAAG) können Punktmutationen eingeführt werden (z.B. Sequenz: GGAGACCCTATGAAG), die den aus einer so mutierten 23SrDNA abgeleiteten Ribosomen Resistenz gegenüber Lincomycin vermitteln (Cseplö A et al. (1988) Mol Gen Genet 214:295-299). Weitere Punktmutation umfassen solche in der 16S rRNA von Tabak, die Resistenz gegenüber Spectinomycin verleihen (Mutation unterstrichen):

a) 5'-GGAAGGTGAGGATGC-3' ("nativ" hier: A)

Andere Mutationen verleihen eine Resistenz gegen Streptomycin:

b) 5'-GAATGAACTA-3' ("nativ" hier: C)

5 1.2 Negative Selektionsmarker

Negative Selektionsmarker ermöglichen beispielsweise die Selektion von Organismen mit erfolgreich deletierten Sequenzen, die das Markergen umfassen (Koprek T et al. (1999) The Plant Journal 10 19(6):719-726). Beispielsweise können so für Selektionsmarker oder für DSBI-Enzyme kodierende Sequenzen nach erfolgreicher Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens wieder aus dem Genom/Plastom deletiert werden.

- 15 Bei der negativen Selektion wird beispielsweise durch den in die Pflanze eingebrachten negativen Selektionsmarker eine Verbindung, die ansonsten für die Pflanze keine nachteilige Wirkung hat, in eine Verbindung mit nachteiliger Wirkung umgesetzt. Ferner sind Gene geeignet, die per se eine nachteilige Wirkung haben, wie zum
- 20 Beispiel TK thymidine kinase (TK) und Diphtheria Toxin A Fragment (DT-A), das codA Genprodukt kodierend für eine Cytosindeaminase (Gleave AP et al. (1999) Plant Mol Biol 40(2):223-35; Perera RJ et al. (1993) Plant Mol Biol 23(4): 793-799; Stougaard J (1993) Plant J 3:755-761), das Cytochrom P450 Gen (Koprek et al. (1999)
- 25 Plant J. 16:719-726), Gene kodierend für eine Haloalkan Dehalogenase (Naested H. (1999) Plant J. 18:571-576), das iaaH Gen (Sundaresan V et al. (1995) Genes & Development 9:1797-1810) oder das tms2 Gen (Fedoroff NV & Smith DL (1993) Plant J 3:273-289).
- 30 Die jeweils für die Selektion verwendeten Konzentrationen der Antibiotika, Herbizide, Biozide oder Toxine müssen an die jeweiligen Testbedingungen bzw. Organismen angepasst werden. Beispielfhaft seien für Pflanzen zu nennen Kanamycin (Km) 50 bis 100 mg/L, Hygromycin B 40 mg/L, Phosphinothricin (Ppt) 6 bis 20
- 35 mg/L, Sepctinomycin (Spec) 15 bis 500 mg/L.

Ferner können funktionelle Analoga der genannten Nukleinsäuren kodierend für Selektionsmarker exprimiert werden. Funktionelle Analoga meint hier all die Sequenzen, die im wesentlichen die

- 40 gleiche Funktion haben d.h. zu einer Selektion transformierter Organismen befähigt sind. Dabei kann das funktionelle Analogon sich in anderen Merkmalen durchaus unterscheiden. Es kann zum Beispiel eine höhere oder niedrigere Aktivität haben oder auch über weitere Funktionalitäten verfügen.

Funktionelle Analoga meint ferner Sequenzen, die für Fusionsproteine kodieren bestehend aus einem der bevorzugten Selektionsmarker und einem anderen Protein zum Beispiel einem weiteren bevorzugten Selektionsmarker, einem der unten genannten Reporterproteine oder einer PLS. Beispielhaft sei eine Fusion des GFP (grün fluoreszierenden Proteins) und des aadA Gens genannt (Sidorov VA et al. (1999) Plant J 19:209-216).

2. Reportergene

10

Reportergene kodieren für leicht quantifizierbare Proteine, die über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz, des Expressionsortes oder -zeitpunktes oder die Identifizierung transgener Pflanzen gewährleisten. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Gene kodierend für Reporter-Proteine (siehe auch Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie

- 20 - "green fluorescence protein" (GFP) (Chui WL et al., Curr Biol 1996; 6:325-330; Leffell SM et al., Biotechniques. 23(5):912-8, 1997; Sheen et al. (1995) Plant Journal 8(5):777-784; Haseloff et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(6):2122-2127; Reichel et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93(12):5888-5893; Tian et al. (1997) Plant Cell Rep 16:267-271; WO 97/41228).
- Chloramphenicoltransferase,
- 30 - Luziferase (Millar et al., Plant Mol Biol Rep 1992 10:324-414; Ow et al. (1986) Science, 234:856-859); erlaubt Biolumineszenzdetektion.
- β -Galactosidase, kodiert für ein Enzym für das verschiedenen chromogene Substrate zur Verfügung stehen.
- 35 - β -Glucuronidase (GUS) (Jefferson et al., EMBO J. 1987, 6, 3901-3907) oder das uidA Gen, das ein Enzym für verschiedene chromogene Substrate kodiert.
- 40 - R-Locus Genprodukt:Protein, das die Produktion von Anthocyaninpigmenten (rote Färbung) in pflanzlichen Gewebe reguliert und so eine direkte Analyse der Promoteraktivität ohne Zugabe zusätzlicher Hilfsstoffe oder chromogener Substrate ermöglicht (Dellaporta et al., In: Chromosome
- 45 Structure and Function: Impact of New Concepts, 18th Stadler Genetics Symposium, 11:263-282, 1988).

- β -Lactamase (Sutcliffe (1978) Proc Natl Acad Sci USA 75:3737-3741), Enzym für verschiedene chromogene Substrate (z.B. PADAC, eine chromogenes Cephalosporin).
- 5 -- xylE Genprodukt (Zukowsky et al. (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80:1101-1105), Catecholdioxygenase, die chromogene Catechole umsetzen kann.
- Alpha-Amylase (Ikuta et al. (1990) Bio/technol. 8:241-242).
- 10 - Tyrosinase (Katz et al. (1983) J Gen Microbiol 129:2703-2714), Enzym, das Tyrosin zu DOPA und Dopakuinon oxidiert, die infolge das leicht nachweisbare Melanin bilden.
- 15 - Aequorin (Prasher et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268), kann in der Calcium-sensitiven Biolumineszenzdetektion verwendet werden.

Der Selektionsmarker bzw. das Reportergen ist bevorzugt auf dem Transformationskonstrukt, besonders bevorzugt auf der Insertionssequenz kodiert. Er kann aber auch auf einem unabhängigen Transformationskonstrukt kodiert sein, welches in einer Co-Transformation mit dem Transformationskonstrukt von Interesse in den Kern oder die Plastiden einer Pflanzenzelle eingebracht wird.

25 Das erfindungsgemäße Transformationsvektoren und Insertionssequenzen können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff der weitere Funktionselemente ist breit zu verstehen. Bevorzugt sind all solche Elemente gemeint, die einen Einfluss auf Herstellung, Vermehrung, Funktion, Nutzen oder Wert der im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Einsatz kommenden Insertionssequenzen, Transformationskonstrukte oder -vektoren haben. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien für die weiteren Funktionselemente zu nennen:

- 35 i. Replikationsursprünge (ORI; origin of DNA replication), die eine Vermehrung der erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren in zum Beispiel E. coli oder aber auch in Plastiden gewährleisten. Beispielhaft für E.coli ORIs seien genannt der pBR322 ori, der P15A ori (Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) oder der colE1-ORI beispielsweise aus pBLUESCRIPT. Plastidäre ORI sind beschrieben in US 5,693,507, US 5,932,479 oder WO 99/10513.
- 40
- 45

67.

- ii. Multiple Klonierungsregionen (MCS) erlauben und erleichtern die Insertion eines oder mehrerer Nukleinsäuresequenzen.
- iii. Sequenzen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom bzw. Plastom eines Wirtsorganismus ermöglichen.
- iv. Elemente zum Beispiel "Bordersequenzen", die einen Agrobakterien-vermittelte Transfer in Pflanzenzellen für die Übertragung und Integration ins Pflanzengenom ermöglichen, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.

Die Einführung einer Insertionssequenz oder eines Expressionskonstruktes für ein DSBI-Enzym kann vorteilhaft unter Verwendung von Vektoren realisiert werden, in die diese Konstrukte bzw. Kassetten insertiert werden. Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren, Retroviren oder auch Agrobakterien sein.

In einer vorteilhaften Ausführungsform wird die Einführung der Expressionskassette mittels Plasmidvektoren realisiert. Bevorzugt sind solche Vektoren, die eine stabile Integration der Expressionskassette in das Wirtsgenom bzw. -plastom ermöglichen.

Die Herstellung eines transformierten Organismus oder einer transformierten Zelle erfordert, dass die entsprechende DNA in die entsprechende Wirtszelle bzw. in die Plastiden derselben eingebracht wird. Für diesen Vorgang, der als Transformation bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (siehe auch Keown et al. (1990) Methods in Enzymology 185:527-537). So kann die DNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion, Elektroporation oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethylenglycol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die Transformation kann auch durch Fusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen erfolgen. Zu nennen sind ferner die Transfektion unter Einsatz von Calciumphosphat, DEAE-Dextran oder kationischen Lipiden, Transduktion, Infektion, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Sonikation sowie die Transformation intakter Zellen oder Gewebe durch Mikro- oder Makroinjektion in Gewebe oder Embryonen, Gewebeelektroporation oder die Vakuuminfiltration von Samen. Derartige Verfahren sind dem Fachmann geläufig. Im Falle von Injektion oder Elektroporation von DNA in pflanzliche Zellen sind keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plasmide wie die der

pUC-Reihe können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert werden, so ist es nützlich, das sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet. Auch die Verfahren zur Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen sind beschrieben.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die DNA in die Plastiden einzuschleusen. Für die vorliegende Erfindung ist lediglich entscheidend, dass die DNA in die Plastiden eingebracht wird. Die vorliegende Erfindung ist jedoch nicht limitiert auf ein bestimmtes Verfahren. Jedes Verfahren, das ein Einbringen der zu transformierenden DNA in die Plastiden einer höheren Pflanze erlaubt, ist geeignet. Die stabile Transformation von Plastiden ist ein dem Fachmann geläufiges Verfahren und wurde für höhere Pflanzen beschrieben (u.a. bei Svab Z und Maliga P (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90(3):913-917). Die Methoden beruhen zum Beispiel auf einer Transformation mittels "Particle Gun" und einer Insertion in das plastidäre Genom durch homologe Rekombination unter Selektionsdruck. Weitere Methoden sind beschrieben in US 5,877,402. In EP-A 0 251 654 wird die DNA mittels *Agrobacterium tumefaciens* eingeführt (s. De Block M et al. (1985) EMBO J 4:1367-1372; Venkateswarlu K und Nazar RN (1991) Bio/Technology 9:1103-1105). Ferner wurde gezeigt, dass man mittels Elektroporation DNA in isolierte Chloroplasten einbringen und so eine transiente Expression erzielen kann (To KY et al. (1996) Plant J 10:737-743). Bevorzugt ist eine Transformation mittels eines direkten Transfers der DNA in Plastiden von Protoplasten beispielsweise unter Verwendung von PEG (Polyethylenglykol) (Koop HU et al. (1996) Planta 199:193-201; Kofer W et al. (1998) In Vitro Cell Dev Biol Plant 34:303-309; Dix PJ und Kavanagh TA (1995) Euphytica. 85:29-34; EP-A 0 223 247). Am meisten bevorzugt sind biolistische Transformationsverfahren. Dabei wird die zu transformierende DNA auf z.B. Gold- oder Wolframpartikel aufgebracht. Diese Partikel werden anschließend auf das zu transformierende Explantat beschleunigt (Dix PJ und Kavanagh TA (1995) Euphytica. 85:29-34; EP-A 0 223 247). Anschließend werden in der dem Fachmann geläufigen Weise transplastome Pflanzen unter Selektionsdruck auf geeignetem Medium regeneriert. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (z.B. US 5,451,513; US 5,877,402; Svab Z et al. (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87:8526-8530; Svab Z und Maliga P (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90:913-917). Darüber hinaus kann die DNA mittels Mikroinjektion in die Plastiden eingebracht werden. Ein besonderes Verfahren der Mikroinjektion wurde kürzlich beschrieben (Knoblauch M et al. (1999) Nature Biotech 17:906-909; van Bel AJE et al. (2001) Curr Opin Biotechnol 12:144-149). Dieses Verfahren ist für die vorliegende Erfindung

besonders bevorzugt. Es ist auch möglich, durch Protoplastenfusion die Plastiden aus einer Art in eine andere Art einzubringen, diese dort zu transformieren und anschließend durch Protoplastenfusion diese wieder in die ursprüngliche Art zu
5 überführen (WO 01/70939).

- Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* durchgeführt werden
- 10 (Horsch RB (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83(8):2571-2575; Fraley et al. (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80:4803-4807; Bevan et al. (1983) Nature 304:184-187). Die Expressionskassette beispielsweise für das DSBI-Enzym wird bevorzugt in spezielle Plasmide integriert, entweder in einen Zwischenvektor (englisch: shuttle
15 or intermediate vector) oder einen binären Vektor. Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren können sowohl in *E. coli* als auch in *Agrobacterium* replizieren und können direkt in *Agrobacterium* transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet 163:181-187). Verschiedene binäre Vektoren
20 sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. USA; Bevan et al. (1984) Nucl Acids Res 12:8711). Das Selektionsmarkergen erlaubt eine Selektion transformierter *Agrobacteria* und ist zum Beispiel das nptII Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht.
25 Das Binärplasmid kann beispielsweise durch Elektroporation oder andere Transformationsmethoden in den *Agrobacterienstamm* übertragen werden (Mozo & Hooykaas 1991, Plant Mol. Biol. 16, 917-918). Die Kokultur der pflanzlichen Explantate mit dem *Agrobacterienstamm* findet in der Regel für zwei bis drei Tage statt.
30 Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende *Agrobacterium* sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Viele Stämme von *Agrobacterium tumefaciens* sind in der Lage, genetisches Material zu übertragen, wie z.B. die Stämme EHA101[pEHA101] (Hood EE et al. (1996) J Bacteriol
35 168(3):1291-1301), EHA105[pEHA105] (Hood et al. (1993) Transgenic Research 2:208-218), LBA4404[pAL4404] (Hoekema et al. (1983) Nature 303:179-181), C58C1[pMP90] (Koncz and Schell (1986) Mol Gen Genet 204:383-396) und C58C1[pGV2260] (Deblaere et al. (1985) Nucl Acids Res 13: 4777-4788).
40
- Für den Transfer der DNA auf die pflanzliche Zelle werden pflanzliche Explantate mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kokultiviert. Ausgehend von infiziertem Pflanzenmaterial (z.B. Blatt-, Wurzel- oder Stengelteile, aber
45 auch Protoplasten oder Suspensionen von Pflanzenzellen) können ganze Pflanzen unter Verwendung eines geeigneten Mediums, dass zum Beispiel Antibiotika oder Biozide zur Selektion trans-

formierten Zellen enthalten kann, regeneriert werden. Ein mit-
transformierter Selektionsmarker erlaubt die Selektion von trans-
formierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986)
Plant Cell Reports 5:81-84). Die erhaltenen Pflanzen können in
5 üblicher Weise gezüchtet, geselbstet und gekreuzt werden. Zwei
oder mehr Generationen sollten kultiviert werden, um sicher-
zustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich
ist. Die genannten Verfahren sind beispielsweise beschrieben
bei Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in:
10 Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, heraus-
gegeben von Kung SD und Wu R, Academic Press, S.128-143 sowie
bei Potrykus (1991) Ann Rev Plant Physiol Plant Molec Biol
42:205-225).

15 Die Agrobakterium-vermittelte Transformation ist am besten für
dicotyledone Pflanzenzellen geeignet, wohingegen die direkten
Transformationstechniken sich für jeden Zelltyp eignen.

Die Agrobakterium-vermittelte Transformation wird besonders
20 bevorzugt für die Kerntransformation, die direkten Trans-
formationstechniken besonders bevorzugt für die Plastiden-
transformation eingesetzt.

Sobald eine überwiegend homotransplastome Pflanzenzelle nach dem
25 erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurde, kann eine voll-
ständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Ver-
fahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kallus-
kulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zellmassen kann
die Bildung von Spross und Wurzel in bekannter Weise induziert
30 werden. Die erhaltenen Sprösslinge können ausgepflanzt und
gezüchtet werden.

Deletionsverfahren

35 Bei den beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren ist es auf
verschiedenen Stufen vorteilhaft, bestimmte zuvor eingeführte
Sequenzen (beispielsweise für Selektionsmarker und/oder DSBI-
Enzyme) wieder aus dem Plastom oder Genom der Pflanze oder Zelle
zu entfernen. So ist es von Vorteil aber nicht zwingend erforder-
40 lich, den Selektionsmarker, der beispielsweise bei der Insertion
einer nicht-natürlichen DBS-Erkennungssequenz eingeführt wurde,
aus der Masterpflanze wieder zu entfernen, weil dann in einer
nachfolgenden Transformation (z.B. mit der Insertionssequenz)
wieder der gleiche Selektionsmarker genutzt werden kann. Eine
45 Deletion ist insbesondere vorteilhaft, da der Selektionsmarker
nach der Selektionsphase nicht mehr unbedingt erforderlich und
daher überflüssig ist. Die Deletion erhöht zudem die Verbraucher-

akzeptanz und ist unter zulassungstechnischen Überlegungen wünschenswert. Zudem wird der Proteinsyntheseapparat des Plastides nicht unnötig durch die Synthese des Markerproteins belastet, was sich potentiell vorteilhaft auf die Eigenschaften 5 der entsprechenden Pflanze auswirkt.

- Zur gezielten Deletion von Sequenzen sind dem Fachmann verschiedenen Verfahren bekannt. Zu nennen ist beispielsweise jedoch nicht einschränkend die Excision mittels Rekombinasen.
- 10 Verschiedene sequenzspezifische Rekombinationssystemen sind beschrieben wie das Cre/lox-System des Bacteriophagen P1 (Dale EC und Ow DW (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:10558-10562; Russell SH et al. (1992) Mol Gen Genet 234: 49-59; Osborne BI et al. (1995) Plant J. 7, 687-701), das FLP/FRT System der Hefe (Kilby 15 NJ et al. (1995) Plant J 8:637-652; Lyznik LA et al. (1996) Nucleic Acids Res 24:3784-3789), die Gin Rekombinase des Mu Phagen, die Pin Rekombinase aus E. coli oder das R/RS System des pSR1 Plasmids (Onouchi H et al. (1995) Mol Gen Genet 247:653-660; Sugita K et al. (2000) Plant J 22:461-469). Diese Verfahren sind 20 nicht nur für die Deletion von DNA Sequenzen aus dem Kerngenom, sondern auch aus dem Plastom nutzbar (Corneille et al. (2001) Plant J 27: 171-178; Hajdukiewicz et al. (2001) Plant J 27:161-170). Als weitere Rekombinasen können beispielsweise eingesetzt werden: PhiC31 (Kuhstoss & Rao (1991) J Mol Biol 25 222:897-908), TP901 (Christiansen et al. (1996) J Bacteriol 178:5164-5173), xisF aus Anabaena (Ramaswamy et al. (1997) Mol Microbiol 23:1241-1249), Integrase vom Phagen PhiLC3 (Lillehaug et al. (1997) Gene 188:129-136) oder die Rekombinase kodiert vom sre Gen des R4-Phagen (Matsuura et al. (1996) J Bacteriol 30 178:3374-3376).

- In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Deletion jedoch durch intrachromosomalen Rekombination aufgrund von entsprechend eingebrachten Sequenzduplikationen realisiert. Letzteres kann 35 durch das gezielte Einführen von Doppelstrangbrüchen nahe der Sequenz-Duplikationen in seiner Effizienz gesteigert werden (vgl. Fig. 8). Dazu wird die zu deletierende Sequenz beidseitig von Homologiesequenzen H1 und H2 flankiert, die eine ausreichende Länge und Homologie aufweisen, um miteinander zu rekombinieren.
- 40 Die Rekombination wird durch die Induktion mindestens eines sequenzspezifischen Doppelstrangbruches nahe einer der beiden Homologiesequenzen gelegenen weiteren DSB-Erkennungssequenz (die jedoch bevorzugt von der ersten verschieden ist) induziert. Bevorzugt ist diese DSB-Erkennungssequenz zwischen den beiden 45 Homologiesequenzen lokalisiert. Zur Induktion des Doppelstrangbruches wird bevorzugt ein zweites DSBE-Enzym exprimiert oder eingebracht, das von dem ersten unterschieden ist. Besonders

bevorzugt wird dieses Verfahren zur Deletion von Selektionsmarkern aus dem Plastom genutzt.

- Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft die mit dem
- 5 erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten transplastomen, überwiegend homoplastomen Pflanzen, sowie Teile derselben wie Blätter, Wurzeln, Samen, Früchte, Knollen, Pollen oder Zellkulturen, Kallus usw. - abgeleitet von solchen.
- 10 Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft die in dem erfindungsgemäßen Verfahren zum Einsatz kommenden Pflanzen, die eine erfindungsgemäße Expressionskassette für ein DSBI-Enzym oder ein Fusionsprotein aus PLS und DSBI-Enzym enthalten. Dabei liegt - besonders bevorzugt - die Expressionskassette für das Fusions-
- 15 protein aus PLS und DSBI-Enzym unter Kontrolle eines im pflanzlichen Zellkern funktionellen Promotors stabil integriert in die nukleäre DNA vor. Bevorzugt liegt die Expressionkassette kodierend für ein DSBI-Enzym unter Kontrolle eines in pflanzlichen Plastiden aktiven Promotors stabil integriert in das Plastom vor.
- 20 Umfasst sind ferner Teile derselben wie Blätter, Wurzeln, Samen, Knollen, Früchte, Pollen oder Zellkulturen, Kallus usw. - abgeleitet von vorgenannten Pflanzen.

- Von Menschen und Tieren verzehrbare erfindungsgemäße, genetisch
- 25 veränderte Pflanzen können auch beispielsweise direkt oder nach an sich bekannter Aufbereitung als Nahrungsmittel oder Futtermittel verwendet werden.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der
- 30 oben beschriebenen erfindungsgemäßen transplastomen, überwiegend homoplastomen Pflanzen und der von ihnen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile - wie zum Beispiel bei transgenen pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc.-, und transgenes Vermehrungsgut wie Samen oder Früchte, zur Herstellung von Nahrungs-
- 35 oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

- Feinchemikalien meint Enzyme wie beispielsweise die unten genannten industriellen Enzyme, Vitamine wie beispielsweise Tocopherolen und Tocotrienolen (z.B. Vitamin E) und Vitamin B2,
- 40 Aminosäuren wie beispielsweise Methionin, Lysin oder Glutamat, Kohlenhydrate wie beispielsweise Stärke, Amylose, Amylopektin oder Saccharose, Fettsäuren wie beispielsweise gesättigte, ungesättigte und polyungesättigte Fettsäuren, natürliche und synthetische Geschmacks-, Aromastoffe wie beispielsweise Linalo-
- 45 ol, Menthol, Borneon (Kampfer), Pinen, Limonen oder Geraniol und Farbstoffe wie beispielsweise Retinoide (z.B. Vitamin A), Flavonoide (z.B. Quercetin, Rutin, Tangeretin, Nobiletin) oder

Carotinoide (z.B. β -Carotin, Lycopin, Astaxanthin). Besonders bevorzugt ist die Produktion von Tocopherolen und Tocotrienolen sowie Carotinoiden. Die Züchtung der transformierten Wirtsorganismen sowie die Isolierung aus den Wirtsorganismen bzw. aus dem Züchtungsmedium erfolgt mit dem Fachmann bekannten Verfahren. Die Produktion von Pharmazeutika, wie zum Beispiel Antikörpern oder Vakkzinen ist beschrieben (Hood EE, Jilka JM. (1999) Curr Opin Biotechnol. 10(4):382-386; Ma JK und Vine ND (1999) Curr Top Microbiol Immunol. 236:275-92).

10

Insbesondere eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von industriellen Enzymen im Rahmen eines sogenannten "Phytofarming". Beispielfhaft jedoch nicht einschränkend seien für die industriellen Enzyme zu nennen Lipasen, Esterasen, Proteasen, Nitrilasen, Acylasen, Epoxyhydrolasen, Amidasen, Phosphatasen, Xylanasen, Alkoholdehydrogenasen, Amylasen, Glucosidasen, Galactosidasen, Pullulanasen, Endocellulasen, Glucanasen, Cellulasen, Nukleasen, Chitindeacetylasen, Monoaminoxidasen, Lysozyme und Laccasen.

20

Im Rahmen der Erfindung insbesondere bevorzugte Ausführungsformen werden unten im Rahmen der Erläuterungen zu den Abbildungen näher beschrieben.

25 Sequenzen

1. SEQ ID NO: 1
pCB42-94 Basisvektor für die Plastidentransformation.

30 2. SEQ ID NO:2
In die Multiple Klonierungsstelle von pCB42-94 (SEQ ID NO: 1) insertierte Nukleinsäuresequenz. Resultierender Vektor: pCB199-3.

35 3. SEQ ID NO:3
In die Multiple Klonierungsstelle von pCB42-94 (SEQ ID NO: 1) insertierte Nukleinsäuresequenz. Resultierender Vektor: pCB401-20

40 4. SEQ ID NO:4
Expressionkassette aus pCB289-13 zur plastidären Expression der I-PpoI Homing-Endonuklease.

5. SEQ ID NO:5
45 Aminosäuresequenz der durch die Expressionkassette aus pCB289-13 kodierten I-PpoI Homing-Endonuklease.

6. SEQ ID NO:6
Zur Erstellung des Vektors pCB304-25 eingesetztes XhoI /
EglII - Fragment.
- 5 7. SEQ ID NO:7
In die Multiple Klonierungsstelle von pGEMTeasy insertierte
Nukleinsäuresequenz. Resultierender Vektor: pCB220-17
8. SEQ ID NO:8
10 In die Multiple Klonierungsstelle von pBluescript insertierte
Nukleinsäuresequenz. Resultierender Vektor: pCB270-1
9. SEQ ID NO:9
Sequenz aus Vektor pCB315-1: LacZ-Gen mit insertiertem Intron
15 zum Nachweis des Spleißens.
10. SEQ ID NO: 10
L1.LtrB Intron aus Vektor pCB345-34.
- 20 11. SEQ ID NO: 11
Synthetische Sequenz der Homing-Endonuklease I-PpoI (ORF: 16
bis 507)
12. SEQ ID NO: 12
25 Proteinsequenz der Homing-Endonuklease I-PpoI
13. SEQ ID NO: 13
Nukleinsäuresequenz der Homing-Endonuklease I-CpaI aus
30 *Chlamydomonas pallidostigmatica* (Veränderungen zur veröffent-
lichten Sequenz an Pos. 69. Am ATG wurde eine NcoI Schnitt-
stelle eingeführt. (ORF: 4 bis 462)
14. SEQ ID NO: 14
Proteinsequenz der Homing-Endonuklease I-CpaI
35
15. SEQ ID NO: 15
Sequenz enthaltend das CpLSU2 Intron
16. SEQ ID NO: 16: Oligonukleotid-Primer p19
40 5'-TAAGGCCCTCGGTAGCAACGG-3'
17. SEQ ID NO: 17: Oligonukleotid-Primer p20
5'-GGGGTACCAAATCCAACACTAG-3'
- 45 18. SEQ ID NO: 18: Oligonukleotid-Primer p21:
5'-GGAGCTCGCTCCCCGCCGTCGTTC-3'

19. SEQ ID NO: 19: Oligonukleotid-Primer p22
5'-GATGCATGATGACTTGACGGCATCCTC-3'
20. SEQ ID NO: 20: Oligonukleotid-Primer p190
5'-GTCGACAGATCTTTAA-3'
21. SEQ ID NO: 21: Oligonukleotid-Primer p191
5'-AGATCTGTCGACTTAA-3'
22. SEQ ID NO: 22: Oligonukleotid-Primer p199
5'-GATCTCCAGTTAACTGGGGTAC-3'
23. SEQ ID NO: 23: Oligonukleotid-Primer p200
5'-CCCAGTTAACTGGA-3'
24. SEQ ID NO: 24: Oligonukleotid-Primer p218
5'-TTAAGCCAGTTAACTGGGCGGAGCT-3'
25. SEQ ID NO: 25: Oligonukleotid-Primer p219
5'-CCGCCCAGTTAACTGGC-3'
26. SEQ ID NO: 26: Oligonukleotid-Primer p276
5'-TCGAGAAGATCAGCCTGTTATCCCTAGAGTAACT-3'
27. SEQ ID NO: 27: Oligonukleotid-Primer p277
5'-CTAGAGTTACTCTAGGGATAACAGGCTGATCTTC-3'
28. SEQ ID NO: 28: Oligonukleotid-Primer p91
5'-AGAAGACGATCCTAAGG-3'
29. SEQ ID NO: 29: Oligonukleotid-Primer p92
5'-TGAAGACTTGACAAGGAATTTTCGC-3'
30. SEQ ID NO: 30: Oligonukleotid-Primer p102
5'-AGAAGACGATCCTAAATAGCAATATTTACCTTTGGGACCAAAAGTTATCAGGCATG-3'
31. SEQ ID NO: 31: Oligonukleotid-Primer p103
5'-TGAAGACTTGACAAGGAATTTTCGCTACCTTCGAGTACTCCAAAATAATC-3'
32. SEQ ID NO: 32: Oligonukleotid-Prime p207
5'-GAGAAGACATTCTAACACATCCATAACGTGCG-3'
33. SEQ ID NO: 33: Oligonukleotid-Prime p208
5'-TGAAGACTTGACATTTGATATGGTGAAGTAGG-3'

34. SEQ ID NO: 34
Nukleinsäuresequenz kodierend für das Transitpeptid der
kleinen Untereinheit (SSU) der Ribulosebisphosphatcarboxylase
(Rubisco ssu) aus Erbse
- 5
35. SEQ ID NO: 35
Transitpeptid der kleinen Untereinheit (SSU) der Ribulose-
bisphosphatcarboxylase (Rubisco ssu) aus Erbse
- 10 36. SEQ ID NO: 36
Transitpeptid der plastidären Transketolase aus Tabak.
37. SEQ ID NO: 37
Nukleinsäuresequenz kodierend für das Transitpeptid der
plastidären Transketolase aus Tabak (Leseraster 1; pTP09)
- 15
38. SEQ ID NO: 38
Nukleinsäuresequenz kodierend für das Transitpeptid der
plastidären Transketolase aus Tabak (Leseraster 2; pTP10)
- 20
39. SEQ ID NO: 39
Nukleinsäuresequenz kodierend für das Transitpeptid der
plastidären Transketolase aus Tabak (Leseraster 3; pTP11)
- 25 40. SEQ ID NO: 40
Transitpeptid der plastidären Isopentenylpyrophosphat
Isomerase-2 (IPP-2) aus Arabidopsis thaliana.
41. SEQ ID NO: 41
Nukleinsäuresequenz kodierend für das Transitpeptid der
plastidären Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2)
aus Arabidopsis thaliana (Leseraster 1; IPP-9)
- 30
42. SEQ ID NO: 42
Nukleinsäuresequenz kodierend für das Transitpeptid der
plastidären Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2)
aus Arabidopsis thaliana (Leseraster 2; IPP-10)
- 35
43. SEQ ID NO: 43
Nukleinsäuresequenz kodierend für das Transitpeptid der
plastidären Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2)
aus Arabidopsis thaliana (Leseraster 3; IPP-11)
- 40
44. SEQ ID NO: 44
Nukleinsäuresequenz kodierend für den PrbcL Promotor aus
Tabak.
- 45

45. SEQ ID NO: 45
Nukleinsäuresequenz kodierend für den Prps16-107 Promotor aus Tabak.
- 5 46. SEQ ID NO: 46
Nukleinsäuresequenz kodierend für den Prn16 Promotor aus Tabak.
47. SEQ ID NO: 47
10 Nukleinsäuresequenz kodierend für den PaccD-129 Promotor aus Tabak.
48. SEQ ID NO: 48
Nukleinsäuresequenz kodierend für den PclpP-53 Promotor aus
15 Tabak.
49. SEQ ID NO: 49
Nukleinsäuresequenz kodierend für den Prn-62 Promotor aus
20 Tabak.
50. SEQ ID NO: 50
Nukleinsäuresequenz kodierend für den Prps16 Promotor aus Tabak.
- 25 51. SEQ ID NO: 51
Nukleinsäuresequenz kodierend für den PatpB/E-290 Promotor aus Tabak.
52. SEQ ID NO: 52
30 Nukleinsäuresequenz kodierend für den PrpoB-345 Promotor aus Tabak.
53. SEQ ID NO: 53
Nukleinsäuresequenz kodierend für einen Promotor abgeleitet
35 von der Konsensussequenz der $\sigma 70$ Promotoren aus E.coli.
54. SEQ ID NO: 54
Nukleinsäuresequenz kodierend für die 5'-untranslatierte
Region des psbA Gens aus Tabak (5'psbA)
40
55. SEQ ID NO: 55
Nukleinsäuresequenz kodierend für die 5'-untranslatierte
Region einschließlich 5' Anteilen aus dem kodierenden Bereich
des rbcL Gens aus Tabak (5'rbcL).
45

56. SEQ ID NO: 56
Nukleinsäuresequenz kodierend für die 5'-untranslatierte
Region des rbcLs Gens aus Tabak.
- 5 57. SEQ ID NO: 57
Nukleinsäuresequenz kodierend für die 3'-untranslatierte
Region des psbA-1 Gens aus Synechocystis (3'psbA-1)
58. SEQ ID NO: 58
10 Nukleinsäuresequenz kodierend für die 3'-untranslatierte
Region des psbA Gens aus Tabak (3'psbA)
59. SEQ ID NO: 59
15 Nukleinsäuresequenz kodierend für die 3'-untranslatierte
Region des rbcL Gens aus Tabak (3'rbcL)
60. SEQ ID NO: 60
Nukleinsäuresequenz kodierend für synthetische Ribosomen-
bindestellen (RBS)
20
61. SEQ ID NO: 61
Nukleinsäuresequenz kodierend für synthetische Ribosomen-
bindestelle (RBS)
- 25 62. SEQ ID NO: 62
Vollständiges Insert des Vektors pCB304-25
63. SEQ ID NO: 63
BglII / MunI Fragment des Vektors pCB320-192.
30
64. SEQ ID NO: 64: Oligonukleotid-Primer p93
5'-AAAGATCTCCTCACAAAGGGGGTCG-3'
65. SEQ ID NO: 65: Oligonukleotid-Primer p97
35 5'-TCGAAGACTTAGGACCGTTATAG-3'
66. SEQ ID NO: 66: Oligonukleotid-Primer p98
5'-AGGAAGACCTTGTCGGGTAAGTCCG-3'
- 40 67. SEQ ID NO: 67: Oligonukleotid-Primer p95:
5'-CTCAATTGGGGTCTCTGTCCAGGTGCAGG-3'
68. SEQ ID NO: 68: Nukleinsäuresequenz kodierend für Fusions-
proteine aus der nativen I-Ppo-I Nuklease und der der
45 IPP-Plastidenlokalisationssequenz (ORF für I-PpoI: 181-672;
IPP-Transitpeptid: 1-180; native Sequenz von 1-172).

69. SEQ ID NO: 69: Fusionsproteine aus der nativen I-Ppo-I Nuklease und der der IPP-Plastidenlokalisationssequenz.
70. SEQ ID NO: 70: Nukleinsäuresequenz kodierend für lange Version der I-PpoI Homing-Endonuklease.
71. SEQ ID NO: 71: Aminosäuresequenz kodierend für lange Version der I-PpoI Homing-Endonuklease.
72. SEQ ID NO: 72: Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Promotorsequenz abgeleitet von der Konsensussequenz der $\sigma 70$ Promotoren aus E.coli.
73. SEQ ID NO: 73: Nukleinsäuresequenz kodierend für das künstliche Intron TetIVS2a.
74. SEQ ID NO: 74: Insert des Vektors pCB459-1
75. SEQ ID NO: 75: Insert des Vektors pCB478-3
76. SEQ ID NO: 76: Insert des Vektors pCB492-25
77. SEQ ID NO: 77: Oligonukleotidprimer p396
5'-TAGTAAATGACAATTTTCCTCTGAATTATATAATTAACATGGCGACTGTTTACCAAAA
AC-3
78. SEQ ID NO: 78: Oligonukleotidprimer p95
5'-CTCAATTGGGGTCTCTCTGTCCAGGTGCAGG-3'
79. SEQ ID NO: 79: Nukleinsäuresequenz kodierend für PCR Produkt Prom-TetIVS2a-Cpa
80. SEQ ID NO: 80: Insert des Vektors pCB435-45
81. SEQ ID NO: 81: Nukleinsäuresequenz kodierend für Sonde für Southernblot-Analyse (gerichtet gegen Teile der 16SrDNA).
82. SEQ ID NO: 82: Nukleinsäuresequenz kodierend für Sonde für Southernblot-Analyse (gerichtet gegen Teile der 23SrDNA).
83. SEQ ID NO: 83: Insert des Vektors pCB456-2.
84. SEQ ID NO: 84: Insert des Vektors pCB528-2, von KpnI bis SacI

Abbildungen

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens sind insbesondere die in nachfolgenden Abbildungen verdeutlichten Ausführungsformen 5 besonders bevorzugt. Für die Abbildungen gelten allgemein nachfolgende Abkürzungen:

- A, A' Paar homologer Sequenzen A und A'
- A/A' Ergebnis einer homologen Rekombination zwischen A und A'
- 10 und/oder eines durch Reperatursynthese bedingten Austausches zwischen A und A'.
- B, B' Paar homologer Sequenzen B und B'
- B/B' Ergebnis einer homologen Rekombination zwischen B und B'
- 15 und/oder eines durch Reperatursynthese bedingten Austausches zwischen B und B'.
- H1, H2: Paar homologer Sequenzen H1 und H2
- H1/2: Sequenz als Ergebnis der homologen Rekombination aus H1 und H2
- DS funktionelle DSB-Erkennungssequenz
- 20 nDS nicht funktionelle "Halbseite" einer DSB-Erkennungssequenz
- E: DSBI-Enzym
- P: Promotor
- I: weitere Nukleinsäuresequenz (Gen von Interesse)
- 25 S, S' Positiver Selektionsmarker
- NS Negativer Selektionsmarker
- IS Intronsequenzen. Das Intron ist insgesamt als Box gekennzeichnet. Die Box umfasst alle für ein funktionelles Intron erforderlichen Elemente.

30

- Wie bereits oben beschrieben stellt A/A' bzw. B/B' das Ergebnis einer homologen Rekombination und/oder eines durch Reperatursynthese bedingten Austausches dar. Die resultierende Sequenz kann wiederum Ausgangssequenz für weitere homologe Rekombinationen bzw. Reperatursynthesen sein. Zur Vereinfachung wird diese Sequenz (A/A' bzw. B/B') in nachfolgenden Schritten wieder als A bzw. B bezeichnet.

35

1. Fig. 1: Einführung einer DSB-Erkennungssequenz in das Plastom mittels Doppeltem "Cross-Over"

40

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform 1 wird zunächst ein DSBE-Konstrukt in Plastiden einer höheren Pflanze eingebracht. Das DSBE-Konstrukt wird in dieser Ausführungsform 45 bevorzugt mit homologen Zielregionen und mit einem exprimierbaren Selektionsmarker (Promotor - 5'UTR - Selektionsmarker - 3'UTR) ausgerüstet und enthält in dieser Ausführungsform bevorzugt eine

81

Erkennungsregion für ein DSBI-Enzym, welches bevorzugt keine natürliche Erkennungssequenz im Plastidengenom der (nicht-transformierten) betrachteten Pflanze besitzt. Das DSBE-Konstrukt kann - optional - bereits weitere Gene von Interesse kodieren. Es werden überwiegend homoplastome Masterpflanzen erzeugt (Fig. 1).

2. Fig.2A-E: Einführung einer Insertionssequenz mit einer Expressionskassette für eine DSBI-Enzym und ggf. Selektionsmarker sowie weiteren Genen von Interesse

10

Explantate der durch Ausführungsform 1 hergestellten Masterpflanzen werden für eine weitere Transformation mit einem erfindungsgemäßen Transformationskonstrukt genutzt. Das erfindungsgemäße Transformationskonstrukt besitzt bevorzugt beidseitig

15 (Fig. 2A, 2B) oder einseitig (Fig. 2C, 2D) der Insertionssequenz Bereiche, die homolog zum den Sequenzen umgebend die Insertionsstelle des DSBE-Konstruktes sind. Die Insertion erfolgt dann über homologe Rekombination (z.B. Cross-Over) bzw. über eine Reperatursynthese.

20

Besonders bevorzugt sind die zu insertierenden Sequenzen - nach innen an die Homologiesequenzen anschließend - von Teilen der DSBE-Erkennungssequenz flankiert (nDS), die den in Folge eines Schnittes mit dem DSBI-Enzym entstehenden Teilen, entsprechen

25 (Fig. 2B). Somit enthält die Insertionssequenz Sequenzen, die den in Folge eines Schnittes im Plastom entstehenden Enden unmittelbar entsprechenden und so einen besonders effizienten Einbau gewährleisten.

30 Besitzt das Transformationskonstrukt bzw. die Insertionssequenz keine solche homologen Bereiche, wird die Insertionssequenz an diesen Enden bevorzugt mit überhängenden Enden versehen, die auch von dem DSBI-Enzym nach Schneiden des Plastoms der Masterpflanze erzeugt werden (Fig. 2E).

35

Liegt nur eine Homologiesequenz vor, so grenzt an diese in einer besonders bevorzugten Ausführungsform eine nDS-Sequenz (s.o. wie für Fig. 2B beschrieben) an, während die andere Seite der Insertionssequenz mit überhängenden Enden versehen ist, die den

40 vom DSBI-Enzym im Plastom der Masterpflanze erzeugten entsprechen (Fig. 2D).

Optional kodiert die Insertionssequenz für einen weiteren, exprimierbaren Selektionsmarker, der sich funktionell von dem

45 des DSBE-Konstruktes unterscheidet, ggf. ein oder mehrere exprimierbare Gene von Interesse und das exprimierbare DSBI-Enzym, welches die durch das DSBE-Konstrukt eingebrachte

Erkennungssequenz an der Insertionsstelle im Plastidengenom der Masterpflanze "schneidet". Die Insertion der Insertionssequenz des Transformationskonstruktes erfolgt dabei an einer Stelle derart, dass besagte Erkennungsregion nach der Insertion nicht mehr funktionell ist.

3. Fig.3: Einführung einer DSB-Erkennungssequenz in das Plastom mittels Doppeltem "Cross-Over" in einen transkriptionell aktiven Bereich

10

In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform 2 wird zunächst ein DSBE-Konstrukt in Plastiden einer höheren Pflanze eingebracht. Das DSBE-Konstrukt wird in dieser Ausführungsform bevorzugt mit homologen Zielregionen und mit einem exprimierbaren Selektionsmarker ausgerüstet, wobei ein endogener Promotor des Plastoms dazu genutzt wird, und enthält zusätzlich bevorzugt eine Erkennungsregion für ein DSBE-Enzym, welches bevorzugt keine natürliche Erkennungssequenz im Plastidengenom der (nicht-transformierten) betrachteten Pflanze besitzt. Das DSBE-Konstrukt kann bereits für Gene von Interesse kodieren. Es werden überwiegend homoplastome Masterpflanzen erzeugt (Fig. 3).

20

4. Fig.4A-E: Einführung einer Insertionssequenz mit einer Kassette kodierend für eine DSBE-Enzym und ggf. Selektionsmarker sowie weiteren Genen von Interesse

25

Explantate der durch Ausführungsform 2 hergestellten Masterpflanzen werden für eine weitere Transformation mit einem erfindungsgemäßen Transformationskonstrukt genutzt. Das erfindungsgemäße Transformationskonstrukt besitzt bevorzugt beidseitig (Fig. 4A, 4B) oder einseitig (Fig. 4C, 4D) der Insertionssequenz Bereiche, die homolog zum den Sequenzen umgebend die Insertionsstelle des DSBE-Konstruktes sind. Die Insertion erfolgt dann über homologe Rekombination (z.B. Cross-Over) bzw. eine Reperatur-synthese. Besonders bevorzugt sind die zu insertierenden Sequenzen - nach innen an die Homologiesequenzen anschließend - von Teilen der DSB-Erkennungssequenz flankiert (nDS), die den in Folge eines Schnittes mit dem DSBE-Enzym entstehenden Teilen, entsprechen (Fig. 4B). Somit enthält die Insertionssequenz Sequenzen, die den in Folge eines Schnittes im Plastom entstehenden Enden unmittelbar entsprechenden und so einen besonders effizienten Einbau gewährleisten.

30

35

40

Besitzt das Transformationskonstrukt bzw. die Insertionssequenz keine solche homologen Bereiche, wird die Insertionssequenz an diesen Enden bevorzugt mit überhängenden Enden versehen, die auch

45

von dem DSBI-Enzym nach Schneiden des Plastoms der Masterpflanze erzeugt werden (Fig. 4E).

Liegt nur eine Homologiesequenz vor, so grenzt an diese in einer besonders bevorzugten Ausführungsform eine nDS-Sequenz (s.o. wie für Fig. 4B beschrieben) an, während die andere Seite der Insertionssequenz mit überhängenden Enden versehen ist, die den vom DSBI-Enzym im Plastom der Masterpflanze erzeugten entsprechen (Fig. 4D).

10

Optional kodiert die Insertionssequenz für einen weiteren, exprimierbaren Selektionsmarker, der sich funktionell von dem des DSBE-Konstruktes unterscheidet, ggf. ein oder mehrere exprimierbare Gene von Interesse und das exprimierbare DSBI-Enzym, welches die durch das DSBE-Konstrukt eingebrachte Erkennungssequenz an der Insertionsstelle im Plastidengenom der Masterpflanze schneidet. Die Insertion der Insertionssequenz des Transformationskonstruktes erfolgt dabei an einer Stelle derart, dass besagte Erkennungsregion nach der Insertion nicht mehr funktionell ist.

20

5. Fig.5A-E: Einführung einer Insertionssequenz mit einer Kassette kodierend für eine DSBI-Enzym und ggf. Selektionsmarker sowie weiteren Genen von Interesse unter Nutzung natürlicher, endogener DSB-Erkennungssequenzen

25

In einer weiteren, ganz besonders bevorzugten Ausführungsform 3 enthält ein erfindungsgemäßes Transformationskonstrukt ein exprimierbares DSBI-Enzym, welches eine endogene, natürliche Erkennungssequenz im Plastom der betrachteten Pflanze besitzt.

30

Explantate dieser natürlichen Masterpflanzen werden für eine Transformation mit einem erfindungsgemäßen Transformationskonstrukt genutzt. Das erfindungsgemäße Transformationskonstrukt besitzt bevorzugt beidseitig (Fig. 5A, 5B) oder einseitig (Fig. 5C, 5D) der Insertionssequenz Bereiche, die homolog zum den Sequenzen umgebend die Insertionsstelle des DSBE-Konstruktes sind. Die Insertion erfolgt dann über homologe Rekombination (z.B. Cross-Over) bzw. Reperatursynthese.

40

Besonders bevorzugt sind die zu insertierenden Sequenzen - nach innen an die Homologiesequenzen anschließend - von Teilen der DSB-Erkennungssequenz flankiert (nDS), die den in Folge eines Schnittes mit dem DSBI-Enzym entstehenden Teilen, entsprechen (Fig. 5B). Somit enthält die Insertionssequenz Sequenzen, die den in Folge eines Schnittes im Plastom entstehenden Enden unmittel-

45

bar entsprechenden und so einen besonders effizienten Einbau gewährleisten.

Besitzt das Transformationskonstrukt bzw. die Insertionssequenz keine solche homologen Bereiche, wird die Insertionssequenz an diesen Enden bevorzugt mit überhängenden Enden versehen, die auch von dem DSBI-Enzym nach Schneiden des Plastoms der Masterpflanze erzeugt werden (Fig. 5E).

- 10 Liegt nur eine Homologiesequenz vor, so grenzt an diese in einer besonders bevorzugten Ausführungsform eine nDS-Sequenz (s.o. wie für Fig. 5B beschrieben) an, während die andere Seite der Insertionssequenz mit überhängenden Enden versehen ist, die dem vom DSBI-Enzym im Plastom der Masterpflanze erzeugten entsprechen
15 (Fig. 5D).

Die Insertion der Insertionssequenz des Transformationskonstruktes erfolgt dabei bevorzugt an einer Stelle derart, dass besagte Erkennungsregion nach der Insertion nicht mehr
20 funktionell ist. Die Insertionssequenz kodiert bevorzugt für einen exprimierbaren Selektionsmarker (S'), ein oder mehreren Genen von Interesse sowie für das exprimierbare DSBI-Enzym. Der Selektionsmarker ist optional.

- 25 6. Fig. 6A-E: Einführung einer Insertionssequenz mit einer Kassette kodierend für Gene von Interesse und ggf. Selektionsmarker und Einbringung eines DSBI-Enzyms in trans

In weiteren bevorzugten Ausführungsformen 4 wird das DSBI Enzym
30 nicht von dem Transformationskonstrukt kodiert, sondern entweder in trans exprimiert (in Plastiden oder als PLS-Fusionsprotein im Kern) bzw. in Form von RNA oder als Protein in die Plastiden transfiziert. Das DSBI-Enzym erkennt entweder eine künstlich eingeführte (Fig. 6A, 6B) oder natürliche (Fig. 6C, 6D) DSB-
35 Erkennungssequenz. Diese Ausführungsform ist insbesondere dann bevorzugt, wenn das Transformationskonstrukt keine Promotorelemente umfasst, und eine Expression der kodierten Gene erst nach Insertion in das Plastom unter Verwendung plastidärer, endogener Promotoren realisiert wird.

40

Wie bei den bereits oben beschriebenen Ausführungsbeispielen besitzt das Transformationskonstrukt bevorzugt beidseitig (Fig. 6A, 6B) oder einseitig (nicht gezeigt) der Insertionssequenz Bereiche, die homolog zum den Sequenzen umgebend die
45 Insertionsstelle des DSBE-Konstruktes sind. Die Insertion erfolgt

dann über homologe Rekombination (z.B. Cross-Over) bzw. Reperatursynthese.

Besonders bevorzugt sind die zu insertierenden Sequenzen - nach 5 innen an die Homologiesequenzen anschließend - von Teilen der DSB-Erkennungssequenz flankiert (nDS), die den in Folge eines Schnittes mit dem DSBI-Enzym entstehenden Teilen, entsprechen (Fig. 6B, 6D). Somit enthält die Insertionssequenz Sequenzen, die den in Folge eines Schnittes im Plastom entstehenden Enden 10 unmittelbar entsprechenden und so einen besonders effizienten Einbau gewährleisten.

Besitzt das Transformationskonstrukt bzw. die Insertionssequenz keine solche homologen Bereiche, wird die Insertionssequenz an 15 diesen Enden bevorzugt mit überhängenden Enden versehen, die auch von dem DSBI-Enzym nach Schneiden des Plastoms der Masterpflanze erzeugt wird (Fig. 6E). Das Transformationskonstrukt kann zusätzlich eine Sequenz kodierend für ein DSBI-Enzym umfassen. Die Expression erfolgt jedoch erst nach erfolgreicher Insertion in 20 das Plastom, so dass die Bereitstellung einer ersten Menge an funktioneller RNA oder Protein eines DSBI-Enzyms wünschenswert ist.

Liegt nur eine Homologiesequenz vor, so grenzt an diese in einer 25 besonders bevorzugten Ausführungsform eine nDS-Sequenz (s.o. wie für Fig. 6B, 6D beschrieben) an, während die andere Seite der Insertionssequenz mit überhängenden Enden versehen ist, die den vom DSBI-Enzym im Plastom der Masterpflanze erzeugten entsprechen (nicht gezeigt).

30 Die Insertion der Insertionssequenz des Transformationskonstruktes erfolgt dabei bevorzugt an einer Stelle derart, dass besagte Erkennungsregion nach der Insertion nicht mehr funktionell ist.

35 7. Fig.7A-E: Einführung einer Insertionssequenz umfassend eine Intronsequenz mit einer Kassette kodierend für Gene von Interesse und ggf. Selektionsmarker bzw. DSBI-Enzyme

40 In einer weiteren, ganz besonders bevorzugten Ausführungsform 5 ist das Gen von Interesse (sowie optional ein Selektionsmarker S' und/oder das DSBI-Enzym) innerhalb eines Introns kodiert, welches an der gewählten Insertionsstelle funktionell ist, d.h. aus dem 45 dort gebildeten Transkript spleißen kann.

Das erfindungsgemäße Transformationskonstrukt besitzt bevorzugt beidseitig (Fig. 7A, 7B) oder einseitig (nicht gezeigt) der Insertionssequenz Bereiche, die homolog zu den Sequenzen umgebend die Insertionsstelle des DSBE-Konstruktes sind. Die Insertion erfolgt dann über homologe Rekombination (z.B. Cross-Over) bzw. Reparatursynthese.

Besitzt das Transformationskonstrukt bzw. die Insertionssequenz keine solche homologen Bereiche, wird die Insertionssequenz an diesen Enden bevorzugt mit überhängenden Enden versehen, die auch von dem DSBI-Enzym nach Schneiden des Plastoms der Masterpflanze erzeugt wird (nicht gezeigt).

Die Kontrolle der Expression kann mittels eines auf dem Transformationskonstrukt enthaltenen Promotors (Fig. 7B) oder einem endogenen, plastidären Promotor realisiert werden (Fig. 7A). Im ersten Fall ist das DSBI-Enzym bevorzugt auf dem Transformationskonstrukt enthalten (Fig. 7B), während es im letzteren Fall (zumindest parallel) entweder in trans exprimiert (in Plastiden oder als PLS-Fusionsprotein im Kern) bzw. in Form von RNA oder als Protein in die Plastiden transfiziert wird (Fig. 7A).

Die Insertion der Insertionssequenz des Transformationskonstruktes erfolgt dabei bevorzugt an einer Stelle derart, dass besagte Erkennungsregion nach der Insertion nicht mehr funktionell ist. Das Transformationskonstrukt kann zusätzlich optional eine Sequenz kodierend für ein DSBI-Enzym umfassen. Die Expression erfolgt jedoch erst nach erfolgreicher Insertion in das Plastom, so dass die Bereitstellung einer ersten Mengen an funktioneller RNA oder Protein eines DSBI-Enzyms wünschenswert ist.

8. Fig.8: Deletion von Sequenzen mittels intramolekularer homologer Rekombination induziert durch sequenz-spezifische Doppelstrangbrüche

Sequenzen - beispielsweise kodierend für Selektionsmarker bzw. DSBI-Enzyme - sind bei allen oben beschriebenen Ausführungsformen bevorzugt von Homologiesequenzen H1 und H2 flankiert, die eine ausreichende Länge und Homologie aufweisen, um miteinander zu rekombinieren. Die Rekombination wird durch die Induktion mindestens einen Doppelstrangbruches zwischen den beiden Homologiesequenzen gelegenen DSB-Erkennungssequenz induziert. Zur Induktion des Doppelstrangbruches wird bevorzugt ein DSBI-Enzym transient exprimiert oder eingebracht (Fig. 8).

Dem Fachmann ist bewusst, dass die Reihenfolge der exprimierten Gene in einem Operon austauschbar ist und insofern in den oben beschriebenen Ausführungsformen variieren kann. Auch kann bei Verwendung nur einer Homologiesequenz zu Insertion der Insertionssequenz diese an der 5'- (wie in den Abbildungen gezeigt) oder 3'-Seite des Doppelstrangbruches lokalisiert sein. Prinzipiell kann das DSBI-Enzym auf dem Transformationskonstrukt und/oder separat (im Kern oder Plastiden) exprimiert oder anderweitig - beispielsweise durch Transfektion mit RNA oder Protein in Plastiden - eingebracht werden.

9. Fig.9: Southern Analyse von überwiegend homotransplastomen Pflanzen

Wildtyp und überwiegend homotransplastome Masterpflanzen wurden bezüglich der Modifikation (Einführung einer DSB-Erkennungssequenz) analysiert (vgl. Beispiel 4). Durch die Modifikation wurde eine Bande von 1750 bp detektiert (Bahn 2, 3, und 4 entsprechend den Linien CB199NTH-4, -6, und -8), während in der nicht modifizierten Wildtyppflanze eine Bande von 3100 bp detektiert wurde (Bahn 1).

10. Fig.10: Modifizieren der IGS des Tetrahymena LSU Intron.

Großbuchstaben zeigen die Sequenz des Intron, während Kleinbuchstaben die Sequenz der umgebenden Exons darstellen. Gezeigt sind die flankierenden Exonsequenzen, der 5'- und 3'- Anteil des Introns bzw. des Intronderivates sowie die Sequenz umfassend die IGS. Balken zwischen den Basen deuten mögliche Basenpaarungen an, die zur Initiation des Spleißvorganges ausgebildet werden können.

A: Gezeigt sind die genannten Sequenzabschnitte des natürlicherweise vorkommenden Tetrahymena LSU Intron in seiner natürlichen Exon-Umgebung.

B: Gezeigt sind die genannten Sequenzabschnitte des im Rahmen dieser Erfindung erstellten Tetrahymena LSU Intron-Derivat (TetIVS2a) in der vordefinierten Exonumgebung, wie sie beim CpLSU5 Intron innerhalb der DSB-Erkennungssequenz des DSBI-Enzyms I-CpaI zu finden ist. Fettgedruckte Buchstaben repräsentieren die im Vergleich zur natürlichen Sequenz vorgenommenen Mutationen.

11. Fig. 11:

- 5 A: Southern Analyse mit von mit BamHI geschnittener Gesamt-DNA aus den Tabaklinien CB255+435NTH-16b, -16c, -19 und -20. Als Sonde wurde ein Bereich der 16SrDNA genutzt. Die Banden, welche Plastomkopien repräsentieren, die dem Wildtyp (WT) entsprechen (ca. 3,2 kb Bande detektiert) und die das Transgen tragen (TG) (ca. 2,3 kb Bande detektiert) sind durch Pfeile gekennzeichnet.
- 10 B: Schematische Darstellung von transplastomen Tabakpflanzen, die durch die Insertion der Insertionssequenz aus pCB435-45 entstanden sind; sowie die bei einer entsprechenden Southern-Analyse (vgl. A) zu erwartenden Banden.
- 15 C: Southern Analyse mit von mit HindIII geschnittener Gesamt-DNA aus den Tabaklinien CB255+435NTH-16b, -16c, -19 und -20. Als Sonde wurde ein Bereich der 23SrDNA genutzt. Die Banden, welche Plastomkopien repräsentieren, die dem Wildtyp (WT) entsprechen (ca. 1,1 kb Bande detektiert) und die das Transgen (TG) tragen (ca. 1,5 kb Bande detektiert) sind durch Pfeile gekennzeichnet.
- 20 D: Schematische Darstellung von transplastomen Tabakpflanzen, die durch die Insertion der Insertionssequenz aus pCB255-1 entstanden sind; sowie die bei einer entsprechenden Southern-Analyse (vgl. C) zu erwartenden Banden.
- 25

12. Fig. 12:

- 30 A: Wildtyp und überwiegend homotransplastome Masterpflanzen wurden bezüglich der Modifikation (Einführung einer der I-PpoI DSB-Erkennungssequenz) in einem Southern analysiert. (vgl. Beispiel 14.2). Durch die Modifikation wurde in der hier mit EcoRI behandelten DNA eine Bande von etwa 1,7 kb detektiert (TG) (Bahn 1 und 4 entsprechend den Linien CB456NTH-1 und -15), während in der nicht modifizierten Wildtyppflanze (WT) eine Bande von etwa 3,1 kb detektiert wurde (Bahn 6). (wt - nicht modifizierte Wildtyppflanze; wildtype - zeigt die erwartete Fragmentgröße in nicht modifizierten Wildtyppflanzen an; transgenic - zeigt die erwartete Fragmentgröße in Pflanzen CB456NTH an).
- 35
- 40 B: Schematische Darstellung des EcoRI Fragments, welches in A durch die Hybridisierung mit der Sonde (probe) in einer modifizierten Pflanze CB456NTH zu erwarten war. (trnV - Gen codierend für eine tRNA-Val; rrn16 - Gen codierend für die
- 45

- 16SrRNA; aadA - Gen codierend für einen Selektionsmarker;
3'psbA (Synec) - nicht kodierender Bereich stromabwärts des
psbA-1 Gens aus Synechocystis, hier eingebaut in die Expres-
sionskassette für den Selektionsmarker aadA; Psynth. - syn-
5 thetischer Promotor abgeleitet von der Konsensussequenz für
E. coli 670 Promotoren; DSB-E: DSB-Erkennungssequenz).

Beispiele

10 Allgemeine Methoden:

- Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise,
in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet,
2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die
15 im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungs-
schritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agorosegelelektro-
phorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nuklein-
säuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von
DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von
20 Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter
DNA werden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor
Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt.
Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem
Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer ALF-Express (Pharmacia, Upsala,
25 Schweden) nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc
Natl Acad Sci USA 74:5463-5467)..

Beispiel 1: Erstellen eines Basis Vektors für die Plastiden-
transformation

30

Zunächst wurden aus dem Plastom der Tabak Varietät SR1 die ausge-
wählten Zielregionen mittels PCR kloniert. Die linke Zielregion
wurde dabei mit den Primern p19 und p20 amplifiziert.

35 p19: 5'-TAAGGCCCTCGGTAGCAACGG-3' (SEQ ID NO: 16)

p20: 5'-GGGGTACCAAATCCAACCTAG-3' (SEQ ID NO: 17)

- Zur Amplifikation der rechten Zielregion wurden die Primer p21
40 und p22 verwendet, wobei durch letzteren Primer in den ampli-
fizierten Teil der 16SrDNA zusätzlich zur SR1 Resistenz (binding
type marker) auch noch eine Spectinomycin-Resistenz eingebracht
wurde.

45 p21: 5'-GGAGCTCGCTCCCCGCCGTCGTTC-3' (SEQ ID NO: 18)

p22: 5'-GATGCATGATGACTTGACGGCATCCTC-3' (SEQ ID NO: 19)

Die beiden amplifizierten Regionen wurden in pBluescript bzw. pZeroBlunt kloniert und sequenziert. Die linke und rechte Zielregionen wurden anschließend in das Rückgrat des pUC19 Vektors kloniert. Dazu wurden die Schnittstellen Eco0109I und PvuII des Vektors genutzt. Zwischen die linke und rechte Zielregion wurde eine multiple Klonierungsstelle aus dem pBluescript (von KpnI bis SacI) kloniert. Diese befindet sich im Basisvektor für die Plastidentransformation zwischen den beiden plastidär kodierten Genen trnV und rrn16. Dieser Basisvektor für die Plastidentransformation erhielt die Bezeichnung pCB42-94 (SEQ ID NO: 1). Der Vektor enthält nachfolgende Sequenzelemente:

- 15 a) Position komplementär bp 55-1405: Rechte Zielregion mit dem partiellen Gen der 16SrRNA (komplementär bp 56 bis 1322). In letzterem sind Mutationen für die Streptomycin-Resistenz (SR1, Position bp 346) und Spectinomycin-Resistenz (SPC1, Position bp 68).
- 20 b) Position komplementär bp 2374 bis 1510: Linke Zielregion umfassend u.a. ORF131 (bp 1729 bis 2124) und trnV Gen (komplementär bp 1613 bis 1542).
- c) Position bp 1404 bis 1511: multiple Klonierungsstelle
- 25 d) Position bp 2629 bis 3417: Ampicilin Resistenz im Vektor-rückgrat

Beispiel 2: Erstellen eines Vektors (pCB199-3) für die Einbringung einer nicht natürlicherweise vorkommenden Erkennungsregion für die Homing Endonukleasen I-PpoI in das Plastom von Tabak

In die multiple Klonierungsstelle des Basisvektors pCB42-94 (SEQ ID NO: 1) für die Plastidentransformation wurden sukzessive verschiedene Elemente kloniert:

- a) frt Erkennungsregion (mutiert, enthält keine XbaI Schnittstelle; komplementär 1307-1354)
- 40 b) Expressionskassette zur Expression des Markergens aadA bestehend aus:
 - i) Promotor des Gens für 16SrRNA (komplementär 1191-1281)

91

- ii) 5' untranslatierte Bereich des Tabak rbcL Gens (komplementär 1167-1184) einschließlich mutierter 5' Anteilen des rbcL Gens (Duplikation von 6 AS des rbcL Gens, teilweise mutiert, als Folge der Klonierungsstrategie, so dass eine Fusion codierend für insgesamt 12 Aminosäuren (komplementär 1131-1166) mit dem nachfolgendem Element, dem aadA Gen, entstand)
- iii) aadA Gen (komplementär 336-1130)
- iv) der 3' Bereich des psbA Gens (komplementär 232-323)
- c) Core-Erkennungsregion für die Homing Endonuklease I-PpoI (komplementär 176-190).
- Anstelle der multiplen Klonierungsstelle im Basisvektor für die Plastidentransformation enthält dieser Vektor mit der Bezeichnung pCB199-3 die aufgeführten Elemente im Rahmen der Nukleinsäuresequenz mit der SEQ ID NO: 2. Angegeben ist die Sequenz, die die komplette MCS von KpnI bis SacI ersetzt. In der angegebenen Sequenz gibt es aufgrund der Klonierungsstrategie jedoch keine KpnI Schnittstelle mehr.
- Beispiel 3: Erstellen eines weiteren Vektors (pCB401-20) für die Einbringung einer nicht natürlicherweise vorkommende Erkennungsregion für die Homing Endonukleasen I-PpoI in das Plastom von Tabak
- Im Gegensatz zu dem in Beispiel 2 beschriebenen Vektor pCB199-3 enthält der hier beschriebene Vektor keinen Promotor und 3'UTR, der direkt mit dem Selektionsmarker aadA verknüpft wurde. Vielmehr wird die Expression des aadA Gens ausgehend von dem Promotor des trnV Gens, welches im Plastidengenom bzw. in der linken Zielregion stromaufwärts des aadA Gens lokalisiert ist, gesteuert. Ziel bei der Erstellung dieses Vektors war es, Sequenzduplikationen durch das Ausnutzen von regulatorischen Bereichen aus dem Tabakplastidengenom zu vermeiden. Dazu wurden in die multiple Klonierungsstelle des Basisvektors pCB42-94 für die Plastidentransformation sukzessive verschiedene Elemente kloniert:
- a) Ribosomenbindestelle (komplementär bp 1033 bis 1050)
- b) aadA Gen (komplementär bp 238 bis 1032)

- c) Core-Erkennungsregion für die Homing Endonukleasen I-PpoI...
(komplementär bp 176 bis 190)

Der so erhaltene Vektor vermittelt auch in *E. coli* eine Spectino-
5 mycin Resistenz. Anstelle der multiplen Klonierungsstelle im
Basisvektor pCB42-94 (SEQ ID NO: 1) für die Plastidentrans-
formation enthält dieser Vektor mit der Bezeichnung pCB401-20
die aufgeführten Elemente im Rahmen der Nukleinsäuresequenz mit
der SEQ ID NO: 3. Auch hier ist die gesamte die MCS ersetzende
10 Sequenz (von SacI bis KpnI) angegeben.

Beispiel 4: Erstellen von überwiegend homoplastomischen Tabak
Masterpflanzen, die eine nicht natürliche DSB-
Erkennungssequenz enthalten

15

Das Plasmid pCB199-3 wurde in die Plastiden von Tabak (*Nicotiana
tabacum* cv. Petit Havana) wie im folgenden beschrieben ein-
gebracht. Die regenerierten Pflanzen wurden CB199NTH genannt.
Unabhängige Linien wurden mit verschiedenen Endnummern (z.B.
20 CB199NTH-4) versehen.

Analog wird der Vektor pCB401-20 in die Plastiden von Tabak
eingebracht. Die resultierenden Pflanzen werden entsprechend
mit CB401NTH bezeichnet.

25

Zunächst wurden von in vitro gewachsenen Pflanzen mit einem
sterilen Korkbohrer Blattscheibchen mit einem Durchmesser von
2,0 bis 2,5 cm ausgestochen und je mit der Blattoberseite auf
eine Petrischale mit Beschussmedium [MS-Salze (Sigma-Aldrich):
30 4,3 g/L; Saccharose: 30,0 g/L, Phytoagar (Duchefa, P1003): 0,6 %
(w/v); pH 5,8; nach dem Autoklavieren wurden 1,0 mg/L Thiamin
(Duchefa, T0614) und 0,1 g/L myo-Inositol (Duchefa, I0609) zuge-
geben] platziert. Die vom Agar abgewandte Blattunterseite wurde
mittels der Partikelkanone anschließend beschossen. Dazu wurde
35 zunächst die zu transformierende Plasmid-DNA (aus *E. coli*
gereinigt mittels Nucleobond AX100 Macherey & Nagel) nach
folgendem Protokoll auf 0,6 µm große Goldpartikel aufgebracht
("Coating"). Zunächst wurden 30 mg Goldpulver (BioRad) in Ethanol
aufgenommen. 60 µl von der Goldsuspension wurden in ein neues
40 Eppendorfgefäß überführt und die Goldpartikel durch Zentri-
fugation (für 10 Sekunden) sedimentiert. Die Goldpartikel wurden
zweimal in je 200 µl sterilem Wasser gewaschen und nach einem
weiteren Zentrifugationsschritt in 55 µl Wasser aufgenommen.
Unter ständigem Mischen (Vortexen) wurden schnell hinzugegeben:

45

- 5 µl Plasmid-DNA (1 µg/µl)
- 50 µl 2,5 M CaCl₂

- 20 µl 0,1 M Spermidine

Die Suspension wurde sodann für weitere 3 Minuten auf dem Vortex gemischt und anschließend kurz anzentrifugiert. Die sedimentierten Gold-DNA-Komplexe wurden ein- bis zweimal in je 200 µl Ethanol gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt schließlich in 63 µl Ethanol aufgenommen. Pro Schuss wurden 3,5 µl (entsprechend 100 µg Gold) dieser Suspension auf einen Macrocarrier aufgebracht.

10

- Gemäß den Herstellerangaben wurde die Partikelkanone (BioRad, PDS1000He) vorbereitet und die Blattexplantate in einem Abstand von 10 cm mit den Gold-DNA-Komplexen beschossen. Dabei wurden folgende Parameter verwendet: Vakuum: 27 inch Hg, Druck 1100 psi. Die Explantate werden nach dem Beschuss für 2 Tage in Klimakammern (24°C, 16 h Licht, 8 h Dunkelheit) inkubiert und anschließend mit einem Skalpell in etwa 0,5 cm² große Segmente zerteilt. Diese Segmente wurden dann auf Regenerationsmedium [Beschussmedium zuzüglich 1 mg/L 6-Benzylaminopurin (BAP, Duchefa, B0904) und 0,1 mg/L Naphthylessigsäure (NAA, Duchefa, N0903)] zuzüglich 500 mg/L Spectinomycin (Duchefa, S0188) überführt und für 10 bis 14 Tage unter oben genannten Bedingungen in einer Klimakammer inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Blattsegmente auf frisches Regenerationsmedium zuzüglich 500 mg/L Spectinomycin überführt. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis sich grüne Sprosse an den Explantaten bildeten. Die Sprosse wurden mit einem Skalpel abgetrennt und auf Anzuchtmedium (wie Beschussmedium, jedoch 10 g/L Saccharose anstelle von 30 g/L Saccharose) zuzüglich 500 mg/L Spectinomycin angezogen.

30

- Optional können, um möglichst überwiegend homoplastome Pflanzen zu erhalten, von den regenerierten Pflanzen wiederum Explantate abgeschnitten und auf Regenerationsmedium mit 1000 mg/L Spectinomycin gelegt werden. Regenerierende Sprosse werden in Gläser mit Anzuchtmedium zuzüglich 500 bis 1000 mg/L Spectinomycin gesetzt. Nach dem Bewurzeln werden die Pflanzen ins Gewächshaus transferiert und dort auf Erde bis zur Samenreife herangezogen.

- Im Fall der Transformation mit dem Plasmid pCB199-3 wurden 8 Pflanzen erhalten, die Resistenz gegenüber Spectinomycin zeigten. Mittels PCR und Southern-Analysen wurde nachgewiesen, dass drei dieser Linien (Linien CB199NTH-4, -6 und -8) auch tatsächlich das *aadA* Gen in das Plastidengenom eingebaut haben.

- 45 Zur Analyse der transplastomen Pflanzen nach Southern wurde Gesamt-DNA aus Blättern von transformierten und nicht transformierten Pflanzen mit Hilfe des GenElute Plant Genomic DNA Kit

(Sigma) isoliert. Die DNA wurde dabei in 200 µl Eluat aufgenommen. 86 µl davon wurden je mit 10 µl 10x Restriktionspuffer sowie 40 U Restriktionsendonuklease versetzt und 4 bis 8 h bei der für das Restriktionsenzym empfohlenen Temperatur inkubiert. 5 Anschließend wurde die DNA in dem Fachmann bekannter Weise mit Ethanol präzipitiert und anschließend in 20 µl Wasser aufgenommen. Die Proben wurden anschließend gemäß dem Fachmann bekannten Verfahren auf einem Agarosegel aufgetrennt, die DNA in dem Gel denaturiert und mittels Kapillarblot auf Nylonmembran 10 übertragen.

Eine entsprechende Sonde für die radioaktive Hybridisierung wurde mit Hilfe des HighPrime (Roche) Systems erstellt. Die Membran wurde zunächst 1 h bei 65°C mit HybPuffer (1 % (w/v)) Rinderseumalbumin; 7 % (w/v) SDS; 1 mM EDTA; 0,5 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,2) vorhybridisiert. Anschließend wurde die hitzedenaturierte Sonde hinzugegeben, und es wurde über Nacht bei 65°C hybridisiert. Die Blots wurden anschließend wie folgt gewaschen: einmal Spülen mit 2 x SSPE/0,1 % SDS; für 15 min. 15 bei 65°C waschen mit 2 x SSPE/0,1 % SDS; für 15 min. bei 65°C waschen mit 1 x SSPE/0,1 % SDS und ggf. wurde der letzte Schritt noch einmal wiederholt (20 x SSPE ist 3 M NaCl; 0,2 M NaH₂PO₄; 0,5 M EDTA; pH 7,4).

25 Die Hybridisierung wurde anschließend mit Hilfe eines Phosphorimagers (Molecular Imager FX, BioRad) analysiert.

Beispielsweise wurde mit PstI geschnittene Gesamt-DNA verschiedener Pflanzen, die nach der Transformation mit pCB199-3 regeneriert wurden, mit dem aadA Gen als radioaktiv markierte 30 Sonde (793bp PstI/NcoI Fragment aus pCB199-3) hybridisiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Linien CB199NTH-4, -6 und -8 tatsächlich das aadA Gen in die DNA eingebaut hatten. Des weiteren wurde mit EcoRI und XhoI geschnittene gesamte DNA von 35 CB199NTH-4, -6 und -8 mit einer radioaktiv markierten Sonde (1082 bp Bsp120I/SacI Fragment aus pCB199-3) hybridisiert, welche mit einem Teil der 16S rDNA hybridisiert. Während im Wildtyp (nicht transformierte Pflanze) erwartungsgemäß eine Bande von etwa 3100 bp nachgewiesen wurde, wurde in den transplastomen Linien überwiegend eine Bande bei 1750 bp detektiert, die sich aufgrund der Insertion der Insertionssequenz aus pCB199-3 in das Plastom ergibt (Fig. 9). Die erhaltenen Pflanzen können als überwiegend homotransplastom verstanden werden.

95

Beispiel 5: Erstellen von Transformationsvektoren, die zur Transformation der Plastiden von Masterpflanzen CB199NTH mittels des artifiziellen Homing-Prozesses genutzt werden können

5

5.1 Klonieren der Homing Endonuklease I-PpoI

Die Homing Endonuklease I-PpoI wurde aus 26 synthetisch erstellten Oligonukleotiden mittels PCR in Anlehnung an die Methode von Stemmer WPC et al. (1995) Gene 164: 49-53 erstellt (SEQ ID NO: 11). Die zugrunde liegende Sequenz wurde von der veröffentlichten Sequenz abgeleitet (Accession No. M38131 Nukleotide 86 bis 577). Dabei wurden einige Mutationen eingeführt, um Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen aus dem Gen zu entfernen, von denen aber keine eine veränderte Aminosäuresequenz bedingt. Anschließend wurden sukzessiv folgende Elemente in einem pBluescript KS (Stratagene) Vektorrückgrat vereint, um eine I-PpoI Expressionskassette zu erstellen. Die Sequenz ist von den Schnittstellen KpnI und SacI flankiert.

20

- a) Position 21 bis 111: Prn Promotor
- b) Position 118 bis 135: 5'-untranslatierte Region des rbcL Gens gefolgt von 18 bp kodierend für 6 Aminosäuren des rbcL-Protein (bp 136-152)
- c) Position 154 bis 645: Nukleinsäuresequenz kodierend für I-PpoI.
- d) Position 688-779: 3'-untranslatierte Region des psbA-Gens.

Das resultierende Plasmid wurde mit pCB289-13 bezeichnet. Trotz der in E. coli zu erwartenden Expression des Enzyms I-PpoI wurden keine Beeinträchtigungen des Wachstums festgestellt. Von der KpnI bis zur SacI Schnittstelle ergab sich durch SEQ ID NO: 4 beschriebene Sequenz (Vektorrückgrat ist unverändert das des pBluescript KS).

5.2 Erstellen eines Transformationsvektors für artifizielles Homing mit beidseitig die Insertionssequenz flankierende homologe Regionen

I) ohne I-PpoI in der Insertionssequenz

Bereiche um die I-PpoI Erkennungsregion aus pCB199-3 wurden mit PstI und SacI ausgeschnitten und in die PstI und SacI Schnittstellen des pBluescript legiert. Anschließend wurden aus diesem

96

Vektor nicht benötigte Schnittstellen entfernt, indem er mit PstI und Bsp120I linearisiert wurde und nach einer Behandlung mit dem Klenow-Fragment der Vektor wieder rezirkularisiert wurde. Mit Hilfe kommerziell verfügbarem Enzym I-PpoI (PROMEGA GmbH, Mannheim, Deutschland) wurde in dem erhaltenen Vektor die entsprechende Erkennungsregion geschnitten und dort hinein mittels der synthetischen Oligos p190 und p191 weitere Schnittstellen eingebracht.

10 Oligo p190: 5'-GTCGACAGATCTTTAA-3' (SEQ ID NO: 20)

Oligo p191: 5'-AGATCTGTCGACTTAA-3' (SEQ ID NO: 21)

In die so eingebrachten Schnittstellen SalI und BglII wurde eine
15 Expressionskassette als BglII / XhoI Fragment (SEQ ID NO: 6) bestehend aus folgenden Elementen eingebracht:

- a) Prps16 Promotor (komplementär 1033-1139)
- 20 b) 5'rbcl (komplementär 1007-1024) mit 18 bp codierend für die 6. AS (komplementär 989-1006)
- c) nptII Gen (komplementär 185-988)
- 25 d) 3'rbcl (komplementär 6-143)

Der resultierende Vektor wurde mit pCB304-25 bezeichnet und verlieh auch E. coli Zellen Kanamycin Resistenz. Dieser Vektor wird durch kommerziell verfügbares I-PpoI nicht mehr linearisiert. Das
30 gesamte Insert des Vektors pCB304-25 (Grundgerüst pBluescript; von SacI bis KpnI entsprechend die MCS ersetzend) ist durch SEQ ID NO: 62 beschrieben und umfasst somit folgende Elemente:

- a) Position bp 19 bis 110: 3'psbA aus Tabak
- 35 b) Position bp 149 bis 160: nicht funktionelle "Halbseite" der I-PpoI Erkennungssequenz
- c) Position bp 171 bis 277: Prps16 Promotor
- 40 d) Position bp 286 bis 303: 5'rbcl Sequenz gefolgt von 18bp kodierend für die ersten 6 Aminosäuren des von rbcl Proteins (bp 304-321)
- 45 e) Position bp 322 bis 1125: nptII

97

f) Position bp 1167 bis 1304: 3'rbcl

g) Position bp 1310 bis 1319: nicht funktionelle "Halbseite"
der I-PpoI Erkennungssequenz

5

II) Mit I-PpoI in der Insertionssequenz.

Mit Hilfe der BamHI und EcoRI Schnittstellen wurde in den Vektor pCB304-25 zusätzlich ein BglIII / MunI Fragment eingebracht, welches für eine 5'psbA - I-PpoI Fusion kodierte. Der entstandene Vektor pCB320-192 exprimiert unter Kontrolle des Prps16 Promotor also das nptII Gen und die I-PpoI Homing Endonuklease. Das Bgl II / Mun I Fragment ist durch SEQ ID NO: 63 wiedergegeben und umfasst folgende Elemente:

15

a) Position bp 6 bis 82: 5'psbA

b) Position bp 83 bis 574: I-PpoI

20 5.3 Erstellen eines Transformationsvektors für artifizielles Homing mit einer einseitig die Insertionssequenz flankierenden homologen Region

Aus dem Vektor pCB320-192 wurden durch Restriktion mit KpnI und BglIII die stromaufwärts des Prps16 Promotor gelegenen Elemente, die homolog zu denen in den Masterpflanzen CB199NTH sind, entfernt. An deren Stelle wurde mittels synthetischer Oligonukleotide p199 und p200 eine BstXI Schnittstelle dort eingebracht.

30 p199 5'-GATCTCCAGTTAACTGGGGTAC-3' (SEQ ID NO: 22)

p200 5'-CCCAGTTAACTGGA-3' (SEQ ID NO: 23)

Durch Schneiden mit BstXI kann man nun DNA-Enden erzeugen, die kompatibel zu denen sind, die durch Restriktion mit I-PpoI entstehen. Der erhaltene Vektor wurde mit pCB322-1 bezeichnet. Beispielsweise mit den Enzymen BstXI und SacI kann aus diesem Vektor ein Fragment gewonnen werden, welches an der einen Seite ein zu DNA, die mit I-PpoI an seiner Core-Erkennungsregion geschnitten wurde, kompatibles Ende und an der anderen Seite Homologie zu Plastomsequenzen der Masterpflanzen CB199NTH besitzt.

45

5.4 Erstellen eines Transformationsvektors für artifizielles Homing ohne homologe Bereiche um die Insertionssequenz herum

Aus dem Vektor pCB322-1 wurde mit SacI und BspTI der verbliebende Teil, der homolog zu rekombinanten Plastidensequenzen der Masterpflanze CB199NTH ist, entfernt. Gleichzeitig wurde durch einbringen synthetischer Oligonukleotide p218 und p219 hier eine BstXI Schnittstelle erzeugt, die nach Schneiden mit BstXI DNA-Enden generiert, welche kompatibel zu mit I-PpoI geschnittener DNA sind. Der resultierende Vektor wurde mit pCB347-33 gekennzeichnet.

p218 5'-TTAAGCCAGTTAACTGGGCGGAGCT-3' (SEQ ID NO: 24)

15 p219 5'-CCGCCCAGTTAACTGGC-3' (SEQ ID NO: 25)

Mit dem Enzym BstXI kann aus diesem Vektor ein Fragment isoliert werden, welches auf beiden Seiten DNA-Enden aufweist, welche kompatibel zu den DNA-Enden sind, die das I-PpoI Enzym an seiner Core-Erkennungsregion erzeugt.

Beispiel 6: Ausnutzen der Masterpflanzen CB199NTH für eine Plastidentransformation mittels DSB-Induktion

25 6.1 Nutzen der unter 5.1 und 5.2 erstellten Vektoren zur Transformation der Masterpflanzen CB199NTH durch Ausnutzen des DSB-Enzymes I-PpoI

Das Plasmid pCB304-24 wurde gleichzeitig mit dem Plasmid pCB289-13 wie unter Beispiel 4 beschrieben auf Goldpartikel aufgebracht und in entsprechend den Ausführungen in Beispiel 4 behandelte Explantate der Masterpflanzen CB199NTH geschossen. In Abweichung zu den Beschreibungen in Beispiel 4 erfolgt zunächst eine Inkubation für 10 Tage auf dem Regenerationsmedium ohne Antibiotikum, später wird Kanamycin in einer Konzentration von 50 mg/L verwendet (im Gegensatz zu den in Beispiel 4 angegebenen 500 mg/L Spectinomycin).

Das Plasmid pCB320-192 wurde wie unter Beispiel 4 beschrieben auf Goldpartikel aufgebracht. Nach dem Waschen mit Ethanol wurden noch 20 U kommerziell verfügbarem I-PpoI Enzym (Promega) hinzugegeben. Die weitere Behandlung erfolgt wie oben beschrieben.

Ferner wurde in einem anderen Ansatz 0,5 µg eines mit Hilfe der T7-Polymerase in vitro erstellten Transkriptes gleichzeitig mit dem Plasmid pCB320-192 auf die Goldpartikel aufgebracht. Als Matrize für die in vitro Transkription diente mit HindIII

linearisierte DNA des Plasmides pCB289-13. Das so erstellte Transkript codiert also für I-PpoI. Nach dem Beschuss werden die Explantate der Masterpflanzen wie oben beschrieben weiter behandelt.

5

6.2 Nutzen der unter 5.1 und 5.3 erstellten Vektoren zur Transformation der Masterpflanzen CB199NTH durch Ausnutzen des DSBI-Enzymes I-PpoI und nur einseitig vorhandener homologer Regionen

10

Ein mit BstXI und SacI aus dem Plasmid pCB322-1 ausgeschnittenes Fragment wurde aus einem Agarosegel eluiert. Dieses Fragment wurde anschließend gleichzeitig mit 1 µg in vitro Transkript von mit HindIII linearisierten Plasmid pCB289-13 (vgl. Beispiel 6.1) auf Goldpartikel gebracht. Nach dem Beschuss der Explantate der Masterpflanzen CB199NTH wird die weitere Behandlung wie unter Beispiel 6.1 beschrieben vorgenommen.

15

6.3 Nutzen der unter 5.1 und 5.4 erstellten Vektoren zur Transformation der Masterpflanzen CB199NTH durch Ausnutzen des DSBI-Enzymes I-PpoI ohne homologe Regionen

Aus dem Plasmid pCB347-33 wurde mittels BstXI die Insertionssequenz ausgeschnitten und aus einem Agarosegel eluiert. Dieses Fragment wurde gleichzeitig mit 1 µg in vitro Transkript des mit HindIII linearisierten Plasmides pCB289-13 auf Goldpartikel aufgebracht. Beschuss und nachfolgende Behandlung erfolgt wie unter Beispiel 6.1 ausgeführt.

30 Beispiel 7: Identifizieren von natürlich vorkommenden, endogenen Erkennungsregionen für Homing Endonukleasen in Plastomen verschiedener Pflanzenspezies

Obwohl in den Plastiden höherer Pflanzen keine Homing Endonukleasen bekannt sind, wurden bekannte Plastomsequenzen auf das Vorhandensein von Erkennungsregionen für Homing Endonukleasen hin untersucht. Dies erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms SeqMan II (DNASTAR Inc.). Die Erkennungsregionen, die auf diese Weise identifiziert wurden, sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

40

Es war aufgrund der Computeranalyse nicht möglich, zu entscheiden, ob I-SceI im Plastidengenom eine Erkennungsregion besitzt oder nicht. Die Region, die mit höchster Wahrscheinlichkeit als Erkennungsregion fungieren kann, wurde synthetisch erstellt und als Oligonukleotide p276 und p277 in die XbaI und XhoI Schnittstelle des pBluescript integriert. Das resultierende Plasmid pCB414-1 wurde anschließend mit Hilfe kommerziell ver-

100

fügbarem Enzym I-SceI (Roche) auf das Vorhandensein einer funktionellen Schnittstelle hin analysiert. Tatsächlich wurde das Plasmid durch I-SceI linearisiert. Daraus kann gefolgert werden, dass in Plastiden exprimiertes I-SceI ebenfalls diese Sequenz erkennt und schneidet. Damit ist eine weitere endogene DSB-Erkennungssequenz für ein DSBI-Enzym identifiziert worden.

p276 5'-TCGAGAAGATCAGCCTGTTATCCCTAGAGTAACT-3' (SEQ ID NO: 26)

10 p277 5'-CTAGAGTTACTCTAGGGATAACAGGCTGATCTTC-3' (SEQ ID NO: 27)

Beispiel 8: Klonieren von homologen Bereichen aus dem Tabakplastom, die die endogene Erkennungsregion für die Homing Endonuklease I-CpaI flankieren.

15

Stromauf- und stromabwärts der I-CpaI Erkennungsregion wurden DNA-Fragmente aus der 23S rDNA des Tabakplastom mittels PCR unter Verwendung der Primer p93 und p97 bzw. p98 und p95 amplifiziert.

20 p93: AAAGATCTCCTCACAAAGGGGGTCG (SEQ ID NO: 64)

p97: TCGAAGACTTAGGACCGTTATAG (SEQ ID NO: 65)

p98: AGGAAGACCTTGTCGGGTAAGTCCG (SEQ ID NO: 66)

25

p95: CTCAATTGGGGTCTCTGTCCAGGTGCAGG (SEQ ID NO: 67)

Die so erhaltenen Fragmente wurde zur Konstruktion des Vektors pCB270-1 verwendet. Angegeben ist das Fragment von BssHII bis BssHII des pBlueScript Vektors (SEQ ID NO: 8), wobei das angegebene 5' Ende der Sequenz an der BssHII Schnittstelle zu finden ist, die näher am 3' Ende des lacZ Genes liegt.

Zwischen den stromauf- und stromabwärts der I-CpaI Erkennungsregionen gelegenen DNA Fragmenten wurden zwei BpiI Schnittstellen eingeführt. BpiI erzeugt überhängende Enden, die außerhalb ihrer Erkennungsregion liegen. Durch dieses Vorgehen konnte gewährleistet werden, dass der Vektor pCB270-1 für die nachfolgende Integration verschiedener Introns gleichermaßen genutzt werden kann. Dazu werden an den zu klonierenden Introns einfach überhängende Enden erzeugt, die kompatibel zu den durch BpiI erzeugten Enden im Vektor pCB270-1 sind. Ferner addiert man an die Introns die entsprechenden Nukleotide, die zwischen den beiden Fragmenten der 23S rDNA im Vektor pCB270-1 fehlen. Die ausgewählten Bereiche sind so hoch konserviert, dass aus anderen Pflanzenspezies keine neuen Regionen amplifiziert werden brauchen. Ferner ist in die stromabwärts der I-CpaI Erkennungsregion gelegene

101

Sequenz über die PCR Strategie eine Punktmutation in die 23S rDNA Fragment eingebaut worden, wie sie auch in Lincomycin resistenten Mutanten gefunden wurde. Die in den pBluescript Vektor inserierte Sequenz des Vektors pCB270-1 ist unter der SEQ ID NO: 8
5 wiedergegeben. Die Sequenz umfasst nachfolgende Elemente:

- Fragment der 23SrDNA stromaufwärts der I-CpaI Erkennungsregion: Nukleotide 37 bis 194
- 10 - Fragment der 23SrDNA stromaufwärts der I-CpaI Erkennungsregion: Nukleotide 237 bis 359
- Punktmutation für Lincomycinresistenz: 352 (nativ ist hier A)
- 15 Vektor pCB234-1 ist genauso aufgebaut wie der Vektor pCB270-1, er besitzt lediglich stromabwärts der unten angegebenen Sequenz noch je eine Erkennungsregion für die Restriktionsendonukleasen XhoI und SacI.
- 20 Beispiel 9: Klonieren des CpLSU2 Intron einschließlich der Homing Endonuklease I-CpaI

Aus DNA der Alge *Chlamydomonas pallidostigmatica* (Sammlung von Algenkulturen Göttingen, Culture Collection of Algae at the
25 University Göttingen, SAG Nummer 9.83, *Chlamydomonas segnis*, authentic strain of *Chlamydomonas pallidostigmatica* King) wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden p91 und p92 das CpLSU2 Intron amplifiziert (SEQ ID NO: 15).

30 p91 5'-AGAAGACGATCCTAAGG-3' (SEQ ID NO: 28)

p92 5'-TGAAGACTTGACAAGGAATTTTCGC-3' (SEQ ID NO: 29)

Die Wahl der Oligonukleotide war derart, dass wie oben
35 beschrieben eine Klonierung in die BpiI Schnittstellen des Vektors pCB234-1 möglich war. Die Sequenz umfasst nachfolgende Elemente:

- Position 9-17 - Anteil der Tabak 23S rDNA, der in pCB234-1
40 fehlt
- CpLSU2-Intron: Position 18-893
- I-CpaI ORF: Position 377-835

- Position 894-909 - Anteil der Tabak 23S rDNA, der in pCB234-1 fehlt

Dieses Fragment, welches das CpLSU2 Intron umfasst, wurde in das Rückgrat des Vektors pGEMTeasy (Promega) kloniert (Vektor pCB141-3). Das gesamte Fragment wurde mit BpiI aus diesem Vektor ausgeschnitten und in den mit BpiI linearisierten Vektor pCB234-1 kloniert. Der resultierende Vektor wurde mit pCB254-2 bezeichnet.

10

Beispiel 10: Nukleäres LSU-rRNA Intron aus Tetrahymena thermophila

10.1 Klonieren des nukleären LSU-rRNA Intron aus Tetrahymena thermophila

15

Mittels PCR wurde aus dem Organismus Tetrahymena thermophila das LSU-rRNA Intron amplifiziert. Die Oligonukleotide p102 und p103 wurden wieder derart gewählt, dass an das zu amplifizierende Intron die in pCB234-1 fehlenden Nukleotide der Tabak 23S rDNA

20 angefügt wurden.

p102 (SEQ ID NO: 30):

5'-AGAAGACGATCCTAAATAGCAATATTTACCTTTGGGACCAAAAGTTATCAGGCATG-3'

25 p103 (SEQ ID NO: 31):

5'TGAAGACTTGACAAGGAATTTTCGCTACCTTCGAGTACTCCAAACTAATC-3'

Außerdem ist die *internal guide sequence* (Unterstrichen in p102) durch die Wahl des Oligonukleotides p102 derart gegenüber dem Wildtyp mutiert, dass ein Spleißen dieses Introns an der gewünschten Position in der 23SrDNA vom Tabak möglich ist. Die unter SEQ ID NO: 7 angegebene Sequenz - angegeben ist das PCR Fragment von BpiI bis BpiI Schnittstelle - wurde in das Rückgrat des Vektors pGEMTeasy kloniert. Der erhaltene Vektor wurde mit

35 pCB220-17 bezeichnet. Die Sequenz umfasst nachfolgende Elemente:

- Position 9-12 - Anteil der Tabak 23S rDNA, der in pCB234-1 fehlt

40 - LSU-Intron: Position 13-425

- Position 426-446 - Anteil der Tabak 23S rDNA, der in pCB234-1 fehlt

45 Das Tetrahymena LSU-Intron wurde einschließlich der angefügten, flankierenden Sequenzen aus dem Vektor pCB220-17 mit BpiI ausgeschnitten und in die BpiI Schnittstellen des Vektors pCB234-1

insertiert. Das entstandene Produkt wurde mit pCB255-1 bezeichnet.

10.2 Indirekter Nachweis der Spleißaktivität des Tetrahymena 5 LSU Intron in E. coli

Zum indirekten Nachweis, dass das modifizierte Intron in der vorbestimmten Umgebung innerhalb der I-CpaI Schnittstelle tatsächlich Spleißen kann, wurde das modifizierte Tetrahymena Intron aus pCB220-17 zusammen mit einem Anteil, der die I-CpaI Erkennungsregion aus der Tabak 23SrDNA umgibt, so in das lacZ Gen des pBluescript kloniert, dass im Fall des Spleißens dieses Introns in E. coli (Stamm XL1-Blue) ein funktionelles lacZ Peptid gebildet werden kann. Dessen Expression kann in geeigneten

15 Stämmen durch dem Fachmann geläufige Verfahren durch Umsetzen der Substanz 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactopyranosid (X-Gal) im Medium zu einem blauen Farbstoff nachgewiesen werden. Der entsprechende Vektor wurde mit pCB315-1 bezeichnet. Das lacZ Gen einschließlich des Introns im Vektor pCB315-1 ist durch

20 SEQ ID NO: 9 beschrieben. Das Vektorrückgrat ist identisch zum pBluescript. Die Sequenz umfasst nachfolgende Elemente:

- lacZ-5'Anteil: komplementär (789-765)
- 25 - multiple Klonierungsstelle aus dem pBluescript: komplementär (764-692)
- 23SRDNA Fragment stromaufwärts und einschließlich der I-CpaI Erkennungsregion: komplementär (691-682)
- 30 - modifiziertes Tetrahymena Intron komplementär (681-269)
- 23SRDNA Fragment stromabwärts und einschließlich der I-CpaI Erkennungsregion: komplementär (268-244)
- 35 - multiple Klonierungsstelle aus dem pBluescript: komplementär (243-168)
- lacZ-5'Anteil: komplementär (167-1)

40

Zur Kontrolle wurde ein Plasmid erstellt, das dem pCB315-1 entspricht, nur dass in diesem Plasmid (pCB305-1) das Element für das modifizierte Tetrahymena Intron fehlte. pCB305-1 diente somit als Positivkontrolle, um zu zeigen, dass das lacZ mit den im

45 Leseraster eingebauten Nukleotiden aus der 23SrDNA vom Tabakplastom noch funktionell ist. Dies spiegelt die Situation nach einem korrekten Spleißen des Tetrahymena Intron wieder. XL1-Blue

kompetente Zellen wurden mittels einer dem Fachmann geläufigen Methode mit den Plasmiden pCB315-1 und pCB305-1 transformiert. Je eine Einzelkolonie wurde auf LB (Bactotrypton: 10 g/L, Hefeextrakt: 5 g/L, NaCl: 10 g/L, pH7,5) Platten, die 15g/L Bacto-Agar, 40 µg/L Ampicillin, 75 µg/L IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid) und 80 µg/L X-Gal enthielten, über Nacht bei 37°C inkubiert. Tatsächlich färbten beide Klone blau, was nahe legt, dass das modifizierte Tetrahymena Intron in der nicht natürlichen Umgebung der Tabak 23SrDNA im heterologen Organismus E. coli
10 gespleißt wurde.

10.3: Einfügen von weiteren Sequenzen in das Tetrahymena LSU Intron

15 Zusätzlich zu den Versuchen in Beispiel 10.2 wurde untersucht, ob weitere Elemente in das modifizierte Tetrahymena Intron eingebaut werden können, ohne die Spleißaktivität zu zerstören. Dazu wurde pCB315-1 mit BglII linearisiert und die überhängenden Enden mit Hilfe des Klenow-Fragmentes aufgefüllt. In diesen Vektor wurde
20 so dann ein XhoI-SacI Fragment, wie es in pCB199-3 vorkommt, ebenfalls nach Behandlung mit dem Klenow-Fragment kloniert. Durch diese Klonierung wurde also ein 229bp großes Fragment in das modifizierte Intron eingesetzt. Dieses Fragment enthält eine I-PpoI Erkennungsregion. Unabhängig von der Orientierung mit der
25 das 229bp Fragment in das Tetrahymena Intron insertierte, konnte in dem Test wie unter Beispiel 10.2 beschrieben eine Blaufärbung nachgewiesen werden. Dies legt nahe, dass das Tetrahymena-Intron sowohl an der gewünschten Region in der 23S rDNA Spleißen kann, als auch zusätzliche genetische Information aufnehmen kann und
30 trotzdem weiterhin eine Spleißaktivität gegeben ist.

10.4 Transformation einer natürlichen Masterpflanze und Zerstörung der endogenen I-CpaI Erkennungsregion mit dem modifizierten Tetrahymena Intron

35 Nach dem in Beispiel 8 beschriebenen Prinzip wurde das modifizierte Tetrahymena Intron aus dem Vektor pCB220-17 mit BpiI ausgeschnitten und in den mit BpiI linearisierten Vektor pCB234-1 kloniert. Der resultierende Vektor wurde pCB255-1 genannt.
40 pCB255-1 wird gleichzeitig mit in vitro Transkript vom pCB262-5 (mit SalI linearisiert, Nutzen der T7 Polymerase) nach dem in Beispiel 4 beschriebenen Verfahren auf Goldpartikel aufgebracht. Anschließend werden diese Goldpartikel analog zum Verfahren beschrieben in Beispiel 4 in Tabak Pflanzen, Varietät Petit Havana,
45 geschossen. Gegebenenfalls können die Explantate auf Lincomycin (250 bis 500 mg/L) selektiert werden.

105

Beispiel 11: Ll.LtrB Intron aus *Lactococcus lactis*

Das Ll.LtrB Intron wurde einschließlich weniger Basen der flankierenden Exonsequenzen aus *Lactococcus lactis* mittels PCR 5 durch Ausnutzen der Primer p207 und p208 amplifiziert. Das PCR Produkt wurde in den Vektor pCR2.1TA (Invitrogen) kloniert (pCB345-34) und sequenziert (SEQ ID NO: 10). Es wurden wenige Abweichungen im Vergleich zur veröffentlichten Sequenz gefunden.

10 p207 5'-GAGAAGACATTCCTAACACATCCATAACGTGCG-3' (SEQ ID NO: 32)

p208 5'-TGAAGACTTGACATTTGATATGGTGAAGTAGG-3' (SEQ ID NO: 33)

Das klonierte Fragment in pCB345-34 (von der EcoRI bis zur EcoRI 15 Schnittstelle des pCR2.1TA Vektors) ist durch SEQ ID NO: 10 wiedergegeben. Der Rest des Vektors ist identisch zum Rückgrat des pCR2.1TA. Die Sequenz umfasst nachfolgende Elemente:

- Anteil des natürlichen 5'Exon: komplementär (2540-2527)
- 20 - Intron Ll.LtrB: komplementär (2526-35)
- ORF im Intron: komplementär (1953-154)
- 25 - Anteil des natürlichen 3'Exon: komplementär (34-28)

Beispiel 12: Erstellen eines weiteren Derivates des Tetrahymena LSU Intron und Einbau eines Fremdgens in dieses Intron-Derivat, sowie Transformation in natürliche Ma- 30 sterpflanzen

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung wurde ein artifizielles Intron erstellt, welches genau an der Stelle in das Plastidengenom eingebaut werden kann, an der sich auch das 35 natürliche Intron zugehörig zu der betrachteten DSB-Erkennungssequenz befindet. Im vorliegenden Beispiel wurde das Tetrahymena LSU Intron derart modifiziert, dass es an der mit „^“ gekennzeichneten Position in der im Rahmen dieser Erfindung identifizierten Erkennungsstelle für das DSBI-Enzym I-CpaI im Plastiden- 40 genom höherer Pflanzen spleißen kann: CGATCCTAAGGT^AGCGAAATTC.

Anschließend wurde das Gen codierend für I-CpaI einschließlich einer RBS in das Intron eingebaut. So wurde ein spleißaktives, ein Fremdgen tragendes Intron erstellt, welches mittels des im 45 Rahmen dieser Erfindung gefundenen Prozesses in die Plastiden einer natürlichen Masterpflanze inmitten eines essentiellen Gens (kodierend für die 23S rRNA) eingebaut werden kann.

12.1: Erstellen eines weiteren Tetrahymena LSU Intron-Derivates

Um ein an einer vordefinierten Insertionsstelle ein funktionelles Intronderivat zu erhalten, muß die *internal guide sequence* (IGS) 5 derart angepasst werden, dass sie Basenpaarungen mit dem 5' und 3' Exon eingehen kann. Fig. 10 illustriert, wie diese Anpassung im vorliegenden Beispiel erfolgte, um ein Tetrahymena Intron-Derivat zu erstellen, welches an der natürlichen Insertionsstelle des CpLSU5 Intron innerhalb der I-CpaI Erkennungsregion spleissen 10 kann. Analog kann eine Anpassung an jede beliebige Inertionsstelle vorgenommen werden. Das im Rahmen dieses Beispiels erstellte Intron wurde mit TetIVS2a bezeichnet und ist durch SEQ ID NO: 73 beschrieben.

15 12.2: Indirekter Nachweis der Spleißaktivität des TetIVS2a Introns in E. coli

Analog zum Beispiel 10.2 wurde das TetIVS2a in das lacZ Gen des pBluescript eingebaut. Nach entsprechender Inkubation von E. coli 20 XL1-blue Zellen, die das Plasmid pCB459-1 enthielten, zeigte eine Blaufärbung die Spleißaktivität des TetIVS2a Intron an der gewünschten Position an.

Bestandteile des Inserts aus Plasmides pCB459-1 (SEQ ID NO: 74; 25 Rückgrat entspricht pBluescript)

- lacZ-3' Anteil einschließlich Teile der multiplen Klonierungsstelle aus dem pBluescript (komplementär Pos. 1-254)
- Sequenz aus der I-CpaI Erkennungsregion (komplementär Pos. 30 254-265)
- TetIVS2a (komplementär Pos. 266-678)
- Sequenz aus der I-CpaI Erkennungsregion (komplementär Pos. 679-687)
- lacZ-5' Anteil einschließlich Teile der multiplen Klonierungsstelle aus dem pBluescript (komplementär Pos. 688-791) 35

12.3: Einführen einer weiterer genetischer Information in das TetIVS2a Intron und Nachweis der Spleißaktivität in E. coli

40 Im Rahmen dieses Beispiels wird das Gen kodierend für das DSBII-Enzym I-CpaI in das TetIVS2a eingebracht, ohne dass dieses seine Spleißaktivität an besagter Position innerhalb der I-CpaI Erkennungsregion verliert. Dazu wurde zunächst in den Sequenzabschnitt 45 des TetIVS2a, welcher dem Loop L8 im Tetrahymena LSU Intron entspricht, eine BclI Schnittstelle mittels PCR eingefügt. Anschließend wurde in diese BclI Schnittstelle ein nicht funktionelles

Derivat des Gens codierend für I-CpaI eingebaut. Da die Expression von I-CpaI in E. coli toxisch ist, mußte für den Spleißtest in E.coli ein nicht-funktionelles Gen genutzt werden, welches zuvor dadurch erzeugt wurde, daß das entsprechende Gen an der EcoRI Schnittstelle linearisiert wurde, die überstehenden Enden durch Klenow-Behandlung gegelättet wurden und anschließend die Genabschnitte wieder zusammen ligiert wurden. Dadurch wurde ein Rastorschub im Leserahmen des Gens erzeugt. Durch den Einbau des besagten Intron mit dem nicht-funktionellen Gen in das lacZ Gen des pBluescript erhielten wir das Plasmid pCB478-3 und konnten analog zu Beispiel 12.2 mittels einer Blaufärbung entsprechender Kolonien die Spleißaktivität auch dieses Introns in E. coli an der gewünschten Position innerhalb der I-CpaI Erkennungsstelle nachweisen. Da sich das funktionelle Gen kodierend für I-CpaI nur durch 4 Basen von dem in pCB478-3 genutzten nicht-funktionellen Gen unterscheidet, kann davon ausgegangen werden, daß das Intron auch nach Einbau des funktionellen I-CpaI Gens anstelle des nicht-funktionellen weiterhin die gewünschte Spleißaktivität besitzt.

20

Bestandteile des Inserts aus Plasmides pCB478-3 (SEQ ID NO: 75; Rückgrat entspricht pBluescript)

- lacZ-3' Anteil einschließlich Teile der multiplen Klonierungsstelle aus dem pBluescript (komplementär Pos. 1-265)
- Sequenz aus der I-CpaI Erkennungsregion (komplementär Pos. 256-265)
- TetIVS2a (komplementär Pos. 266-1178), darin enthalten ein nicht-funktionelles Gen für I-CpaI (komplementär Pos. 399-861) sowie einer RBS stromaufwärts des nicht-funktionellen I-CpaI Gens (komplementär 866-870)
- Sequenz aus der I-CpaI Erkennungsregion (komplementär Pos. 1179-1187)
- lacZ-5' Anteil einschließlich Teile der multiplen Klonierungsstelle aus dem pBluescript (komplementär Pos. 1179-1291)

30

35

12.4: Transformation eines sich selbst verbreitenden, artifizialen Intron in einer natürlichen Masterpflanzen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das TetIVS2a Intron an der gewünschten Position spleißen kann und ohne diese Spleißaktivität zu verlieren gleichzeitig weitere genetische Information aufnehmen kann, wurde ein Konstrukt erstellt, welches es ermöglichen soll, das I-CpaI Gen als ein Fremdgen mittels des im Rahmen dieser Erfindung beschriebenen Verfahrens in das Plastidengenom einzubauen, ohne einen Selektionsmarker zu nutzen. Dazu wurde zunächst der Vektor pCB492-25 erstellt, welcher ein Insert mit fol-

45

108

gende Elemente umfasst (SEQ ID NO: 76; Rückgrat entspricht dem des pBluescript; Sequenz ist angegeben von BssHII bis BssHII in pBluescript, wobei die hier am 5' Ende angegebene BssHII Schnittstelle, diejenige im pBluescript ist, die näher am 3' Ende des lacZ Gens lokalisiert ist):

- 23SrDNA Fragment stromaufwärts und einschließlich der I-CpaI Erkennungsregion (Pos. 37-203)
- TetIVS2a (Pos. 204-1112) mit eingefügtem Gen codierend für I-CpaI (Pos. 521-979) sowie RBS (Pos. 512-516)
- 23SrDNA Fragment stromabwärts und einschließlich der I-CpaI Erkennungsregion (Pos. 1113-1247)

Um eine Expression des I-CpaI direkt nach dem Einbringen in Plasmiden von natürlichen Masterpflanzen zu gewährleisten, wurde in vitro ein Promotor stromaufwärts des besagten Intron-Cpa Konstruktes mittels PCR angefügt. Dazu wurden die Primer p396 und p95 sowie pCB492-25 als Matritze genutzt.

p396 (SEQ ID NO: 77):

5'-TAGTAAATGACAATTTTCCTCTGAATTATATAATTAACATGGCGACTGTTTACCAAAAAC-3'

p95 (SEQ ID NO: 78): 5'-CTCAATTGGGGTCTCTCTGTCCAGGTGCAGG-3'

Das entstandene PCR Produkt erhielt die Bezeichnung Prom-TetIVS2a-Cpa, ist beschrieben durch SEQ ID NO: 79 und umfaßte folgende Elemente:

- synthetischer Promotor (Pos. 8-40)
- 23SrDNA aus Tabak stromaufwärts und einschließlich Anteile der I-CpaI Erkennungsregion (Pos. 41-207)
- TetIVS2a (Pos. 208-1116) umfassend Gen codierend für I-CpaI (Pos. 525-983) sowie RBS (Pos. 516-520)
- 23SrDNA aus Tabak stromabwärts und einschließlich Anteile der I-CpaI Erkennungsregion (Pos. 1117-1243)

Das Plasmid pCB492-25 wurde gleichzeitig mit dem beschriebenen PCR-Produkt Prom-TetIVS2a-Cpa wie in Beispiel 4 beschrieben auf Goldpartikel aufgebracht und anschließend auf Wildtyp Tabak geschossen. Durch die Expression des I-CpaI Enzyms soll ein Doppelstrangbruch in der 23SrDNA erfolgen, welcher durch das eingebrachte PCR Produkt oder durch die eingebrachte Insertionssequenz des Plasmides pCB492-25 repariert wird. Dadurch wird die natürlicherweise vorhandene I-CpaI Erkennungsregion in den bereits transformierten Plasmidkopien inaktiviert. Ohne jeglichen Selektionsdruck wurden Pflanzen regeneriert und diese werden mittels

PCR auf die Anwesenheit der Insertionssequenz im Plastom getestet.

Beispiel 13: Verbreitung des modifizierten Tetrahymena LSU Intron aus pCB255-1 in einer natürlichen Masterpflanze durch Expression des DSBI-Enzyms I-CpaI in trans

Im Rahmen dieses Beispiels wird gezeigt, wie ein DSBI-Enzym in den Plastiden von Masterpflanzen zur Expression gebracht werden kann, um eine Insertionssequenz in den Kopien der Masterpflanze effizient zu verbreiten.

13.1: Erstellen eines Vektors für die Plastidentransformation, der die Expression der Homing Endonuklease I-CpaI in Plastiden erlaubt

Zunächst wurde ein Vektor erstellt, der für den Selektionsmarker aadA sowie das DSBI-Enzym I-CpaI kodiert. Da die Expression des I-CpaI Enzyms in E. coli letal ist, wurde der accD Promotor gewählt, um die Expression dieses Enzyms in den Plastiden zu ermöglichen, aber die Expression in E. coli zu verhindern. So konnte dieser Vektor auf konventionelle Art und Weise mit E. coli als Wirtsorganismus erstellt und amplifiziert werden. Der resultierende Vektor wurde mit pCB435-45 bezeichnet und umfaßte ein Insert gemäß SEQ ID NO: 80 mit folgenden Elementen:

- Rechte Zielregion (wie in pCB42-94, siehe oben; komplementär Pos. 66-1403)
- Promotor PaccD (Pos. 1422-1478)
- 30 - RBS (Pos. 1500-1504)
- Gen codierend für I-CpaI (Pos. 1509-1967)
- Expressionskassette für das Markergen aadA bestehend aus:
 - der 3' Bereich des psbA Gens (komplementär Pos. 2065-1974)
 - aadA Gen (komplementär Pos. 2872-2078)
- 35 - 5' untranslatierte Bereiche des Tabak rbcL Gens (komplementär Pos. 2890-2873), teilweise mutiert
- Promotor des Gens für die 16SrRNA (komplementär Pos. 2987 bis 2897)
- Linke Zielregion (wie in pCB42-94, siehe oben; komplementär Pos. 3863-3007)
- 40 - Teile des pBluescript (einschließlich „origin of replication“; Pos. 3864-4746 und 1-65)

110

13.2 Co-Transformation von pCB435-45 und pCB255-1 in natürliche Masterpflanzen

Entsprechend den Ausführungen in Beispiel 4 wurden die Plasmide pCB435-45 und pCB255-1 gleichzeitig auf Goldpartikel aufgebracht und so dann mittels der Partikelkanone in Plastiden von Tabakblättern eingebracht. Analog zu Beispiel 4 wurden Transplastome Pflanzen auf Regenerationsmedium zuzüglich 500 mg/L Spectinomycin selektiert. Sobald Pflänzchen entstanden waren, wurden diese auf Anzuchtmedium zuzüglich 500 mg/L Spectinomycin umgesetzt und Blattmaterial geerntet. Dieses Blattmaterial wurde mittels Southernanalyse unter Verwendung des Dig-Easy Hyb® (Roche Diagnostics; Mannheim) in Hinblick auf den Einbau der beiden Plasmide in das Plastidengenom analysiert. Um den Anteil der Plastomkopien zu bestimmen, die bzgl. der Insertionssequenz aus pCB435-45 transgen waren, wurde eine Sonde benutzt, die eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 81 besaß (gerichtet gegen Teile der 16SrDNA).

Um den Anteil der Plastomkopien zu bestimmen, die bzgl. der Insertionssequenz aus pCB255-1 transgen waren, wurde eine Sonde benutzt, die eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 82 besaß (gerichtet gegen Teile der 23SrDNA).

Fig. 11 zeigt, dass in diesem Experiment 2 Linien (CB255+435NTH-19 und -20) identifiziert wurden, die sowohl bzgl. der Insertionssequenz aus pCB435-45 als auch der aus pCB255-1 transgen sind. Weiter konnte so gezeigt werden, dass überraschenderweise die Insertionssequenz aus pCB255-1 (modifiziertes Tetrahymena LSU Intron) bereits in mehr Kopien des Plastidengenoms verteilt wurde, als die Insertionssequenz aus pCB435-45 - obwohl auf das Ereignis der Insertion der Insertionssequenz aus pCB435-45 selektiert wurde (aadA Markergen befindet sich in pCB435-45). Die Wirksamkeit des im Rahmen dieser Erfindung beschriebenen Verfahrens - nämlich der Insertion und schnellen Verteilung einer Insertionssequenz im Plastidengenom, ohne dass auf die Anwesenheit dieser selektiert würde, durch das Nutzen von DSBII-Enzymen und entsprechende Erkennungsstellen - konnte somit in diesem Beispiel für besagte Linien nachgewiesen werden.

111

Beispiel 14: Erzeugen von weiteren Masterpflanzen mit einer nicht-natürlicherweise in Plastiden vorkommenden DSB-Erkennungsregion, sowie Transformation dieser Pflanzen unter Ausnutzen des DSBI-Enzyms I-PpoI

5

14.1: Erstellen eines weiteren Vektors (pCB456-2) für die Einbringung einer nicht natürlicherweise vorkommenden Erkennungsregion für die Homing Endonuklease I-PpoI in das Plastom von Tabak

10

Ziel dieses Ansatzes war es (analog zu Beispiel 3) einen weiteren Vektor für die Plastidentransformation zu erstellen, welcher keine umfassenden Homologien zu Sequenzen im Plastidengenom besitzt.

15

Der Selektionsmarker *aadA* ist in diesem Plasmid unter Kontrolle eines synthetischen Promotors, der abgeleitet ist von der Konsensus Sequenz für *E. coli* 070 Promotoren. Als 3'Ende wurde ein Bereich stromabwärts des 3'*psbA-1* Gens aus *Synechocystis* genutzt.

20 Im Unterschied zu dem bereits beschriebenen Vektor pCB199-3 wurde hier die DSB-Erkennungssequenz direkt stromabwärts des *aadA* Gens, aber stromaufwärts der 3'*psbA-1* Sequenz aus *Synechocystis* in das Molekül eingeführt. Damit kann man nach Insertion einer Insertionssequenz mit Hilfe eines DSBI-Enzyms ein Operon erstellen. Die
25 Gene auf der Insertionssequenz können dann - optional - ohne Promotor auf der Insertionssequenz insertiert werden. Nach der Insertion gelangen entsprechende Gene der Insertionssequenz dann auch unter Kontrolle des synthetischen Promotors stromaufwärts des *aadA* Gens in der Masterpflanze. Dadurch kann man - optional -
30 eine Operon Struktur bestehend aus dem *aadA* und den nachfolgend eingeführten Genen im Plastom erzeugen.

Zur Herstellung des Plasmides pCB456-2 wurden sukzessive verschiedene Elemente in den Basisvektor pCB42-94 kloniert:

35

- Synthetischer Promotor (komplementär bp 1226-1260)
- Ribosomenbindestelle (komplementär bp 1214-1218)
- *aadA* Gen (komplementär bp 414-1208)
- Core-Erkennungsregion für die Homing Endonuklease I-PpoI
40 (komplementär bp 331-345)
- 3'*psbA-1* aus *Synechocystis* (komplementär bp 19-155)

Der so erhaltene Vektor vermittelt auch in *E. coli* eine Spectinomycin Resistenz. Anstelle der multiplen Klonierungsstelle im Basisvektor pCB42-94 für die Plastidentransformation enthält dieser
45 Vektor mit der Bezeichnung pCB456-2 die aufgeführten Elemente im Rahmen der Nukleinsäuresequenz mit der SEQ ID NO: 83. Auch hier

ist die gesamte MCS ersetzende Sequenz (von SacI bis KpnI) angegeben.

- 14.2: Erstellen von überwiegend homöotransplastomen Masterpflanzen, die eine nicht natürliche DSB-Erkennungssequenz enthalten

Analog zu pCB199-3 in Beispiel 4 wurde der Vektor pCB456-2 in die Plastiden von Tabak eingebracht. Abweichend von der Beschreibung in Beispiel 4 wurden die erhaltenen Sprosse jedoch auf Anzuchtmedium, welches 30 g/L Saccharose enthielt (anstelle der in Beispiel 4 angegebenen 10 g/L), kultiviert. Die resultierenden Pflanzen wurden mit CB456NTH bezeichnet. Mittels Southern-Hybridisierung wurden von den Spectinomycin resistenten Pflanzen, die nach der Transformation erhalten wurden, 2 Linien (CB456NTH-1 und -15, vgl. Fig. 12) identifiziert, die die Insertionssequenz aus pCB456-2 in ihr Plastom eingebaut haben. In dem Southern-Experiment wurde eine Sonde genutzt, welche gegen ein Fragment der 16SrDNA gerichtet war (vgl. oben Beispiel 13.2). Diese Sonde war geeignet, um aus mit EcoRI verdauter DNA, die dem Wildtyp entspricht, ein Fragment von etwa 3,1 kb nachzuweisen. Im Gegensatz dazu wurde ein etwa 1,7 kb großes Fragment detektiert, wenn in die entsprechenden Plastomkopien die Insertionssequenz aus pCB456-2 eingebaut worden war.

25

- 14.3: Erstellen eines Transformationsvektors für artifizielles Homing in den Masterpflanzen CB456NTH

Zunächst wurde eine Operonstruktur bestehend aus den Elementen RBS - nptII (codierend für ein Enzym, welches Kanamycin Resistenz vermittelt) - RBS - I-PpoI (codierend für ein DSB-I-Enzym) erstellt. Diese Kassette wurde mit BstXI Schnittstellen umgeben, die nach Einwirkung des Enzyms BstXI DNA-Enden erzeugen, die kompatibel zu den durch das Enzym I-PpoI erzeugten DNA-Enden sind. Der resultierende Vektor (Rückgrat entspricht dem des pBluescript) wurde mit pCB528-2 bezeichnet, enthält ein Insert gemäß SEQ ID NO: 84 mit folgenden Elementen:

- RBS (Pos. 28-32)
- 40 - nptII (Pos. 27-840)
- RBS (Pos. 849-853)
- Gen codierend für I-PpoI (Pos. 859-1350)

Anschließend wurde mit BstXI das 1360 bp große Fragment aus pCB528-2 heraus geschnitten und in die I-PpoI Schnittstelle im Vektor pCB456-2 ligiert. Aus den erhaltenen Klonen nach Transformation der Ligationsprodukten in E. coli wurden solche ausge-

113

wählt, die eine Kanamycin Resistenz besaßen. Dadurch wurde sichergestellt, dass besagtes Insert in dem entsprechenden Klon derart in den Vektor insertiert war, dass die nptII und I-PpoI Kasette in der selben Orientierung vorlagen, wie die aadA-Kasette. Dies wurde auch durch das dem Fachmann bekannte Verfahren der Restriktionsanalyse verifiziert. Der entsprechende Vektor erhielt die Bezeichnung pCB535-11.

14.4: Transformation von pCB535-11 in Masterpflanzen CB456NTH
10 Analog zu pCB456-2 in Beispiel 14.2 wurde pCB535-11 auf Goldpartikel aufgebracht und anschließend mittels Partikelkanone in Plastiden der Masterpflanze CB456NTH-1 eingebracht.

Ein Teil der Explantate wurde ohne jeglichen Selektionsdruck auf
15 Regenerationsmedium inkubiert. Entstandene Pflanzen wurden auf Anzuchtmedium (wieder ohne Selektionsdruck überführt). Anschließend werden die Pflanzen mittels PCR in Hinblick auf die Anwesenheit der RBS - nptII - RBS - I-PpoI Kasette analysiert.

20 Ein anderer Teil der Explantate wurde auf Regenerationsmedium zusätzlich 15 bzw. 30 mg/L Kanamycin inkubiert. Nach je 2 Wochen werden die Pflanzen auf frisches Regenerationsmedium umgesetzt und die Kanamycinkonzentration sukzessive bis 50 bzw. 80 mg/L erhöht.

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Verfahren zur Integration einer DNA-Sequenz in die plastidäre
5 DNA einer mehrzelligen Pflanze oder von dieser abgeleiteten
Zelle und zur Selektion überwiegend homotransplastomer Zellen
oder Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, dass
 - a) die plastidären DNA-Moleküle besagter mehrzelliger
10 Pflanze mindestens eine Erkennungssequenz zur gezielten
Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen enthalten und
 - b) mindestens ein Enzym geeignet zur Induktion von
15 DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur
gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen sowie
mindestens ein Transformationskonstrukt umfassend eine
Insertionssequenz in mindestens einem Plastid besagter
mehrzelliger Pflanze oder von dieser abgeleiteten Zelle
zusammengebracht werden, und
 - c) die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an den
20 Erkennungssequenzen zur gezielten Induktion von DNA-
Doppelstrangbrüchen erfolgt, und
 - d) die Insertionssequenz in die plastidäre DNA inseriert,
25 wobei die Funktionalität der Erkennungssequenz zur ge-
zielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen deaktiviert
wird, so dass besagte Erkennungssequenz nicht mehr durch
das Enzym geeignet zur Induktion von DNA-Doppelstrang-
30 brüchen geschnitten werden kann, und
 - e) Pflanzen oder Zellen isoliert werden, bei denen die
Insertionssequenz in die plastidären DNA-Moleküle
inseriert wurde.
- 35 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die
Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppel-
strangbrüchen sowie die Insertionssequenz zumindest ein-
seitig von Sequenzen flankiert sind, die eine ausreichende
40 Länge und ausreichende Homologie aufweisen, um eine homologe
Rekombination untereinander zu gewährleisten.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekenn-
45 zeichnet, dass das Transformationskonstrukt mindestens eines
der Elemente beinhaltet ausgewählt aus der Gruppe bestehend
aus

115

- i) Expressionskassette für ein Enzym, geeignet zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen
 - ii) Positiven Selektionsmarkern
 - iii) Negativen Selektionsmarkern
 - iv) Reportergenen
 - v) Replikationsursprüngen
 - vi) Multiple Klonierungsregionen
 - vii) "Border"-Sequenzen für Agrobakterium-Transfektion
 - viii) Sequenzen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass ein Enzym geeignet zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Restriktionsendonukleasen, Homing-Endonukleasen, Chimäre Nukleasen, mutierte Restriktions- oder Homing-Endonukleasen und RNA-Proteinpartikel abgeleitet von mobilen Intronen der Gruppe II, sowie Fusionsproteinen der vorgenannten Proteine mit Plastidenlokalisationssequenzen.
 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym geeignet zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen ausgewählt ist aus der Gruppe der Homing-Endonukleasen bestehend aus F-SceI, F-SceII, F-SuvI, F-TevI, F-TevII, I-AmaI, I-AniI, I-CeuI, I-CeuAIIP, I-ChuI, I-CmoI, I-CpaI, I-CpaII, I-CreI, I-CrepsbIP, I-CrepsbIIP, I-CrepsbIIIP, I-CrepsbIVP, I-CsmI, I-CvuI, I-CvuAIP, I-DdiII, I-DirI, I-DmoI, I-HspNIP, I-LlaI, I-MsoI, I-NaaI, I-NanI, I-NclIP, I-NgrIP, I-NitI, I-NjaI, I-Nsp236IP, I-PakI, I-PboIP, I-PcuIP, I-PcuAI, I-PcuVI, I-PgrIP, I-PobIP, I-PorI, I-PorIIP, I-PpbIP, I-PpoI, I-SPBetaIP, I-ScaI, I-SceI, I-SceII, I-SceIII, I-SceIV, I-SceV, I-SceVI, I-SceVII, I-SexIP, I-SneIP, I-SpomCP, I-SpomIP, I-SpomIIP, I-SquIP, I-Ssp6803I, I-SthPhiJP, I-SthPhiST3P, I-SthPhiS3bP, I-TdeIP, I-TevI, I-TevII,

116

- I-TevIII, I-UarAP, I-UarHGPA1P, I-UarHGPA13P, I-VinIP, ...
 I-ZbiIP, PI-MtuI, PI-MtuHIP, PI-MtuHIIP, PI-PfuI, PI-PfuII,
 PI-PkoI, PI-PkoII, PI-PspI, PI-Rma43812IP, PI-SPBetaIP,
 PI-SceI, PI-TfuI, PI-TfuII, PI-ThyI, PI-TliI, PI-TliII
 5 sowie Fusionsproteinen der vorgenannten mit plastidären
 Lokalisationssequenzen.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekenn-
 zeichnet, dass das Enzym geeignet zur Induktion von DNA-
 10 Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur gezielten
 Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen ausgewählt ist aus der
 Gruppe der Homing-Endonukleasen bestehend aus den Enzymen
 gemäß SEQ ID NO: 5, 12, 14 und 71.
- 15 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekenn-
 zeichnet, dass das Enzym geeignet zur Induktion von DNA-
 Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur gezielten
 Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen unter Verwendung einer
 Expressionskassette exprimiert wird, die eine für das besagte
 20 Enzym kodierende Nukleinsäuresequenz beinhaltet.
8. Expressionkassette enthaltend ein Enzym geeignet zur
 Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungs-
 sequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen
 25 gemäß Definition einer der Ansprüche 4 bis 6 unter Kontrolle
 eines in pflanzlichen Plastiden funktionellen Promotors.
9. Expressionkassette enthaltend ein Fusionsprotein aus einer
 Plastidentranslokalisationssequenz und einem Enzym geeignet
 30 zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungs-
 sequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen
 gemäß Definition einer der Ansprüche 4 bis 6 unter Kontrolle
 eines im pflanzlichen Zellkern funktionellen Promotors.
- 35 10. Mehrzellige Pflanze erhalten nach einem Verfahren gemäß einem
 der Ansprüche 1 bis 7.
11. Mehrzellige Pflanze enthaltend eine Expressionskassette gemäß
 Anspruch 8 insertiert in die plastidäre DNA.
 40
12. Mehrzellige Pflanze enthaltend eine Expressionskassette gemäß
 Anspruch 9 insertiert in die nukleäre DNA.
13. Mehrzellige Pflanze nach einem der Ansprüche 10 oder 12 aus-
 45 gewählt aus der Gruppe bestehend aus Arabidopsis thaliana,
 Tabak, Tagetes, Weizen, Roggen, Gerste, Hafer, Raps, Mais,

117

Kartoffel, Zuckerrübe, Soja, Sonnenblume, Kürbis oder Erdnuss.

14. Zellkulturen, Organe, Gewebe, Teile oder transgenes Vermehrungsgut abgeleitet von einer mehrzellige Pflanze nach den Ansprüchen 10 bis 13.
15. Verwendung eines Organismus nach einem der Ansprüche 10 bis 13 oder von diesem abgeleitete Zellkulturen, Organe, Gewebe, Teile oder transgenes Vermehrungsgut nach Anspruch 14 als Nahrungs-, Futtermittel oder Saatgut oder zur Herstellung von Pharmazeutika oder Feinchemikalien.
16. DNA-Konstrukt umfassend mindestens eine Nukleinsäuresequenz sowie Intronsequenzelemente, die befähigt sind, in einer von besagtem DNA-Konstrukt abgeleiteten Ribonukleinsäuresequenz die Deletion des für besagte Nukleinsäuresequenz kodierenden Ribonukleinsäurefragmentes zu gewährleisten, wobei besagte die Nukleinsäuresequenz in Bezug auf besagte Intronsequenzelemente heterolog ist.
17. DNA-Konstrukt nach Anspruch 16, wobei die Nukleinsäuresequenz zumindest von einer Spleißakzeptorsequenz und einer Spleißdonorsequenz flankiert ist.
18. DNA-Konstrukt nach Anspruch 16 oder 17, wobei das DNA-Konstrukt am 5'- und 3'-Ende Sequenzen H1 bzw. H2 umfaßt, die eine ausreichende Länge und Homologie zu plastidären Sequenzen H1' bzw. H2' aufweisen, um eine homologe Rekombination zwischen H1 und H1' bzw. H2 und H2' und damit eine Insertion der von H1 und H2 flankierten Sequenz in das Plastom zu gewährleisten.
19. Transgene Plastiden-DNA umfassend mindestens eine Nukleinsäuresequenz sowie Intronsequenzelemente, die befähigt sind, in einer von besagter transgenen Plastiden-DNA abgeleiteten Ribonukleinsäuresequenz die Deletion des für besagte Nukleinsäuresequenz kodierenden Ribonukleinsäurefragmentes zu gewährleisten, wobei die besagte Nukleinsäuresequenz in Bezug auf besagte Intronsequenzelemente heterolog ist.
20. Transgene Plastiden-DNA nach Anspruch 19, wobei die Nukleinsäuresequenz zumindest von einer Spleißakzeptorsequenz und einer Spleißdonorsequenz flankiert ist.
21. Transgene Pflanze, umfassend eine transgene Plastiden DNA gemäß Anspruch 20.

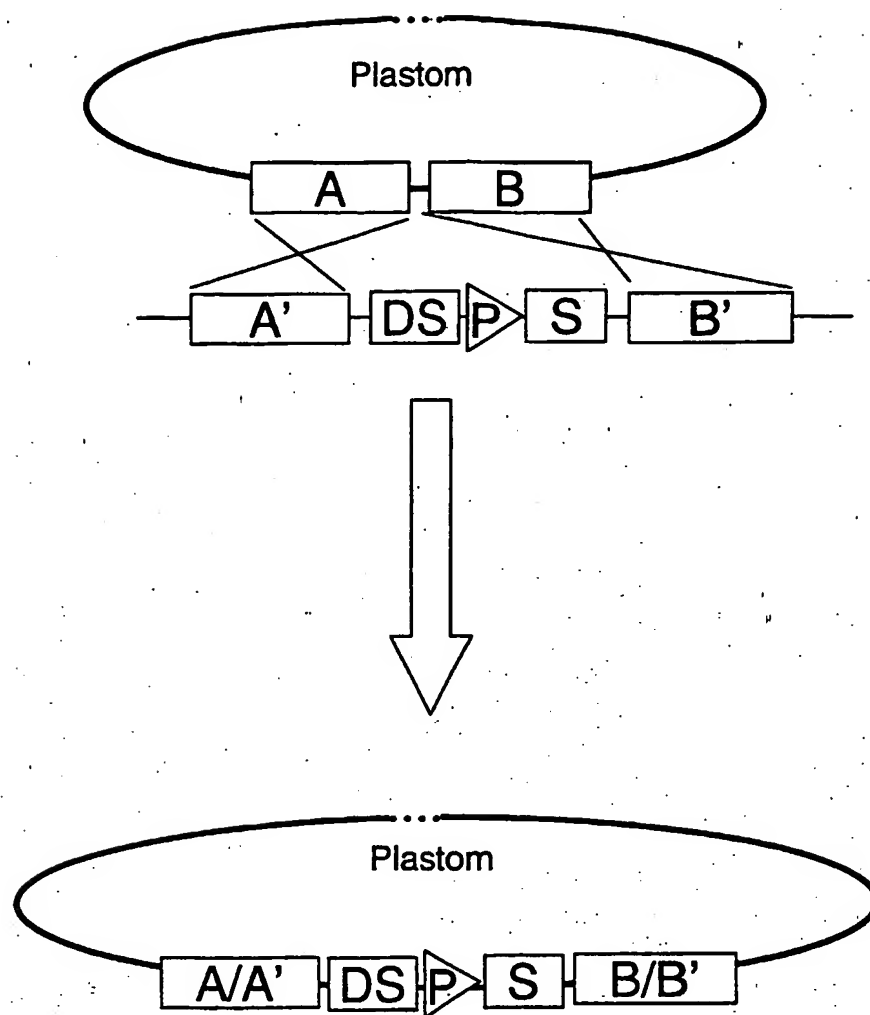


Fig. 1

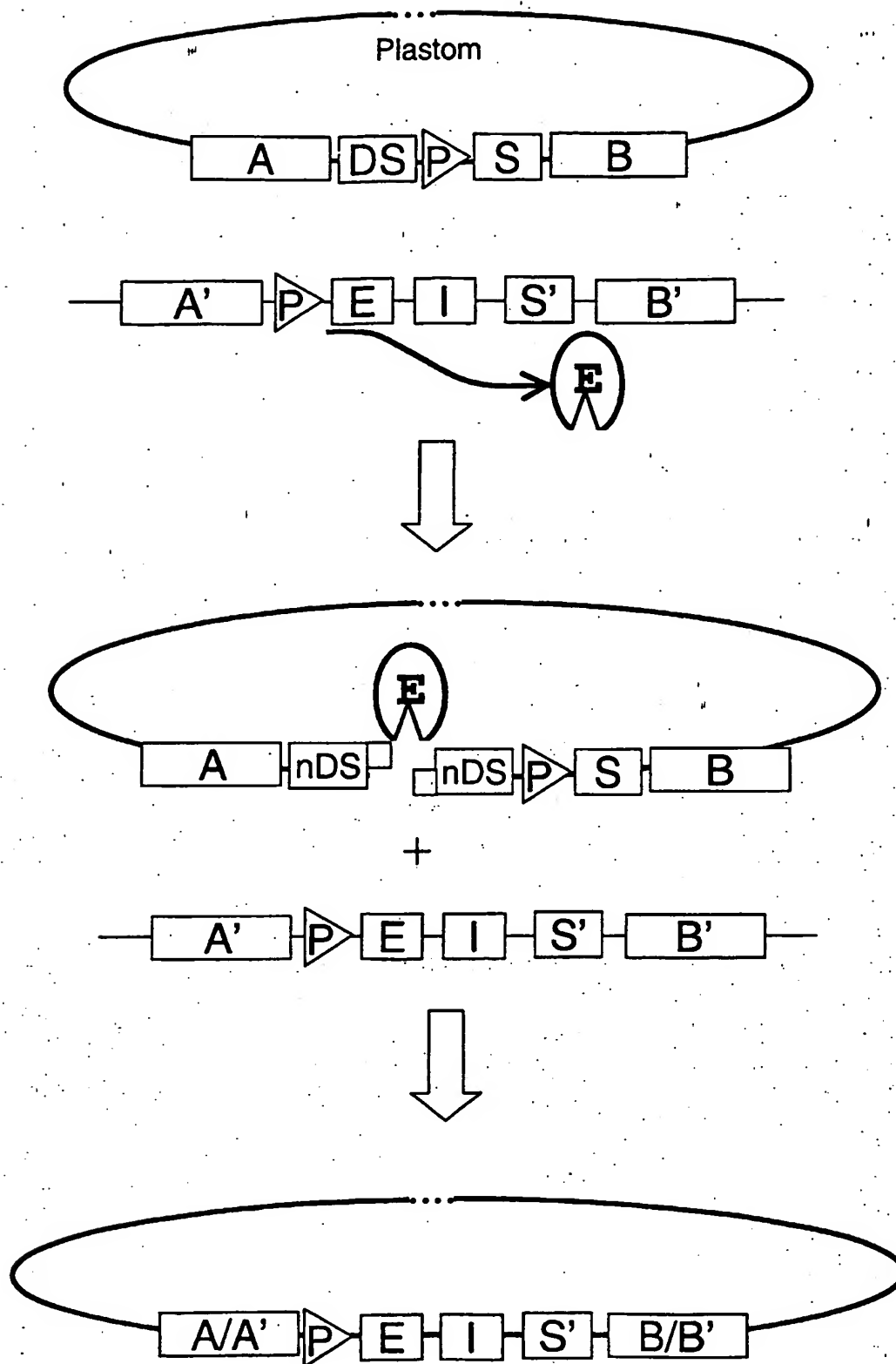


Fig. 2A

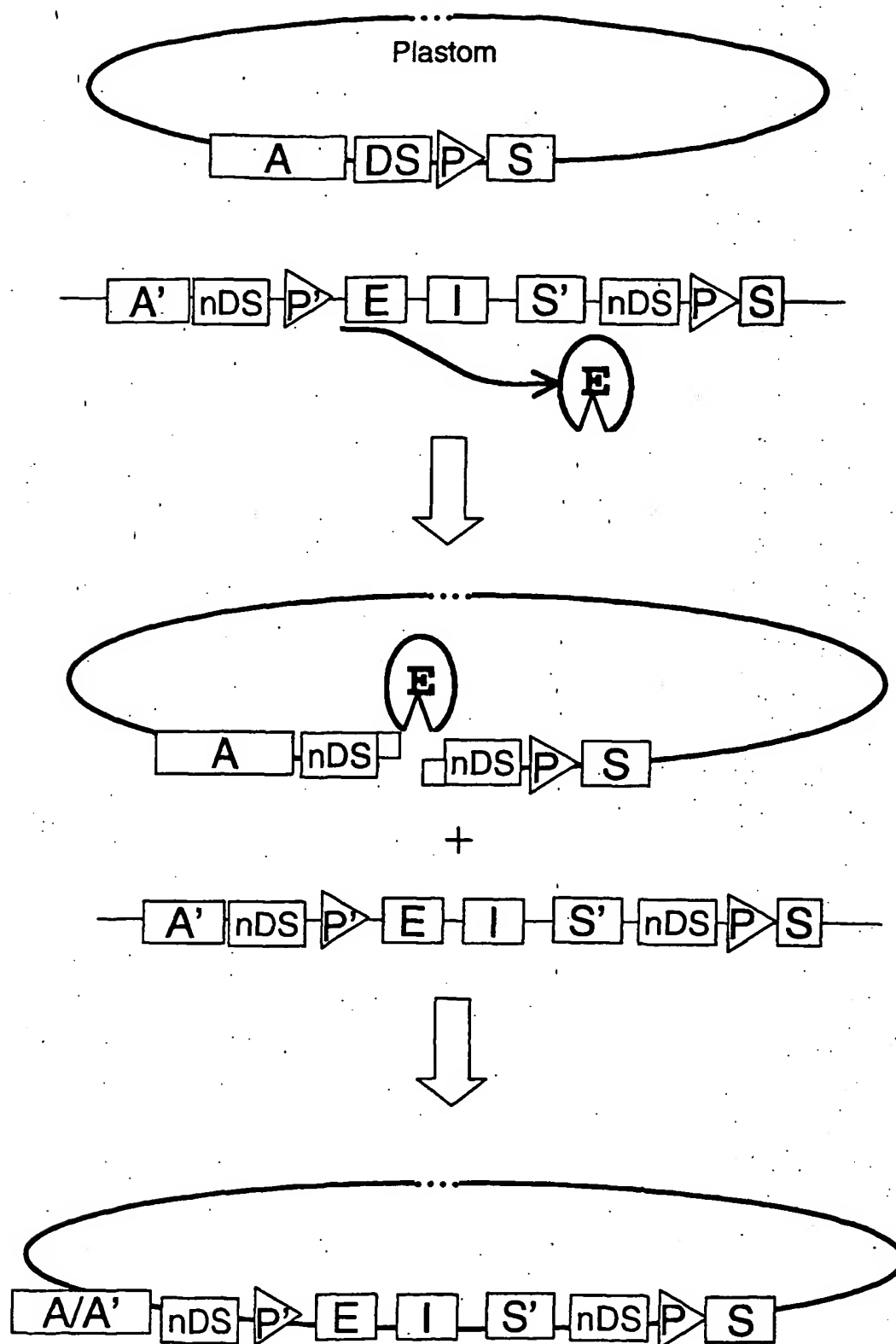


Fig. 2B

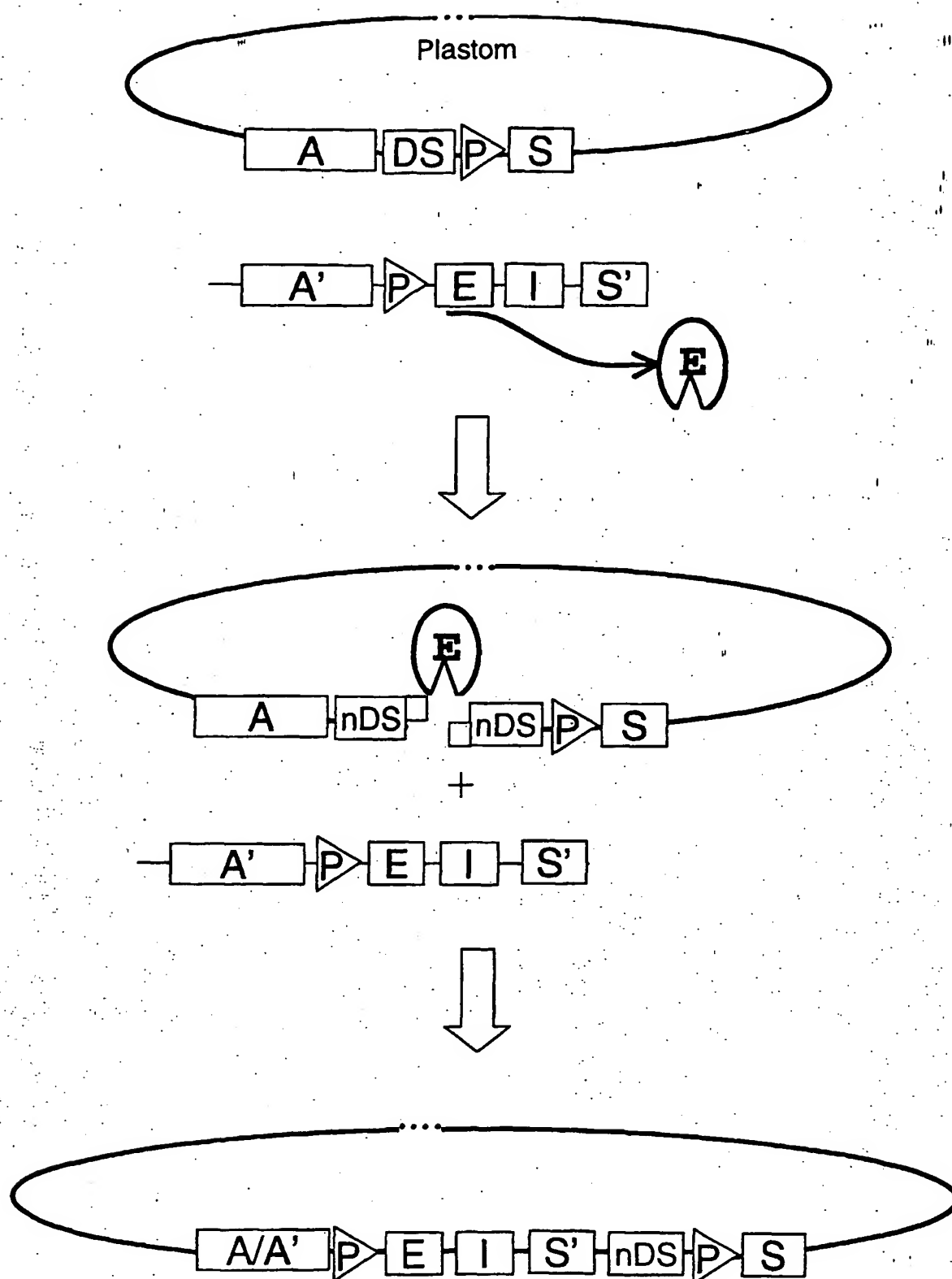


Fig. 2C

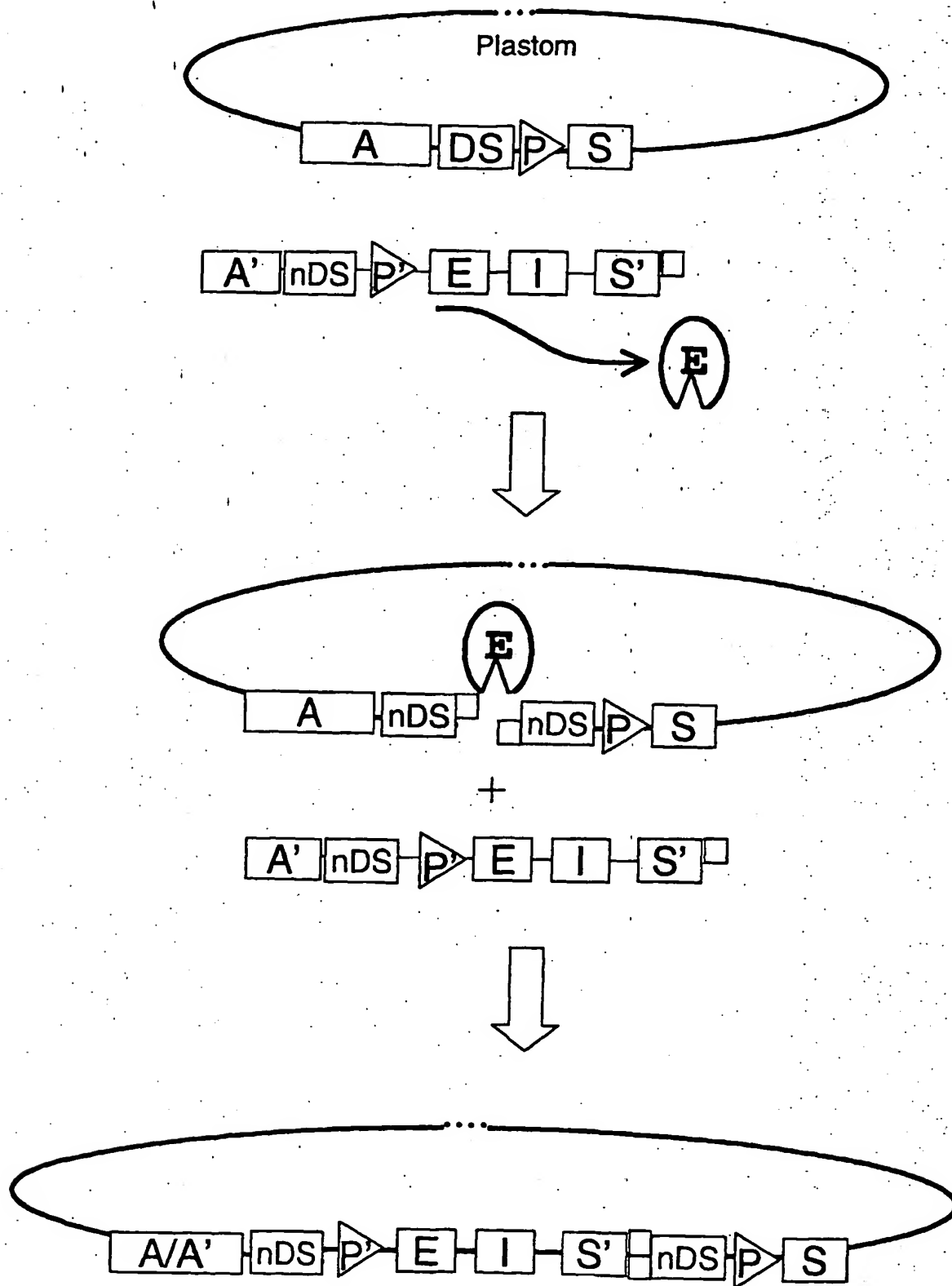


Fig. 2D

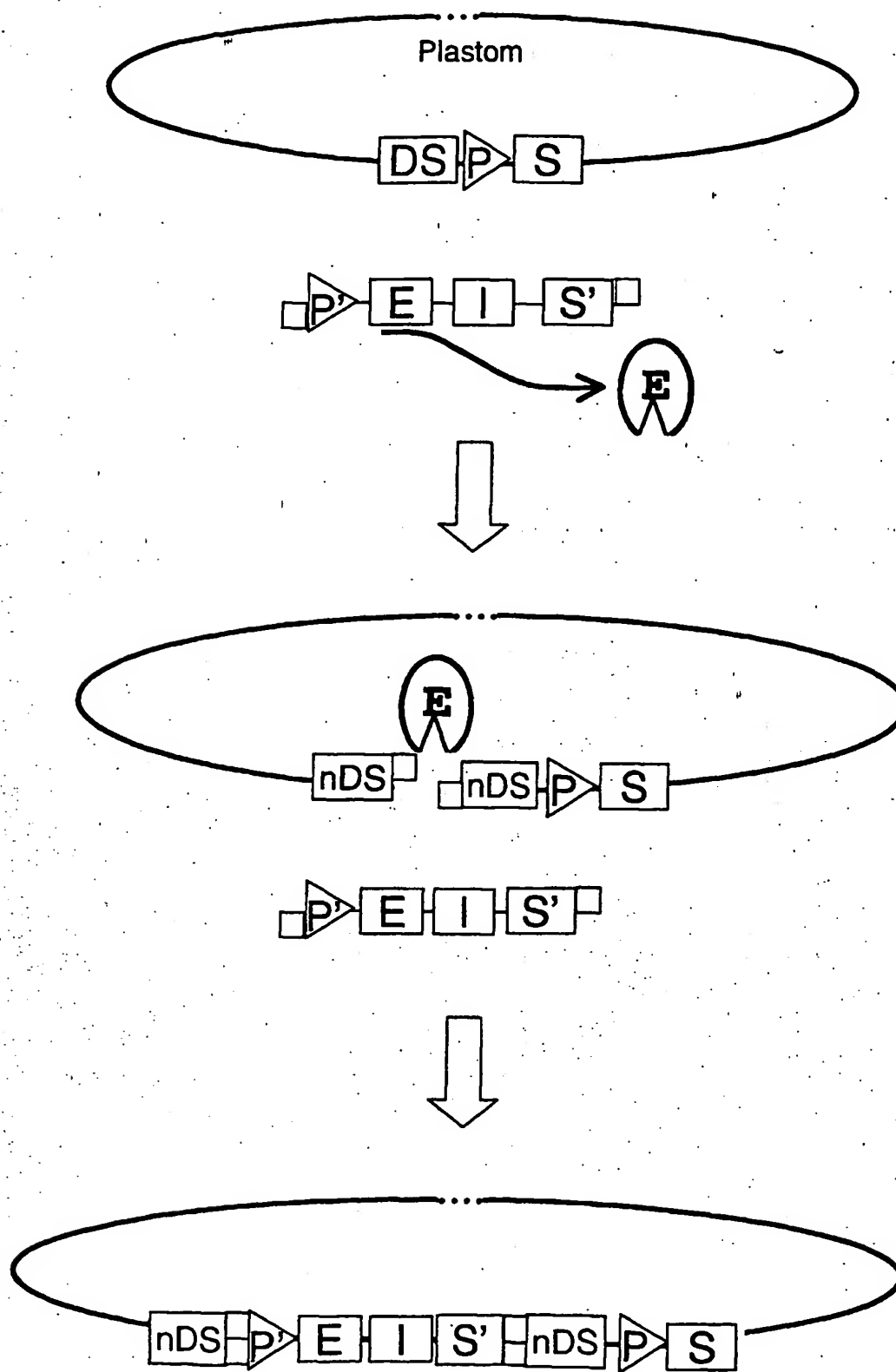


Fig. 2E

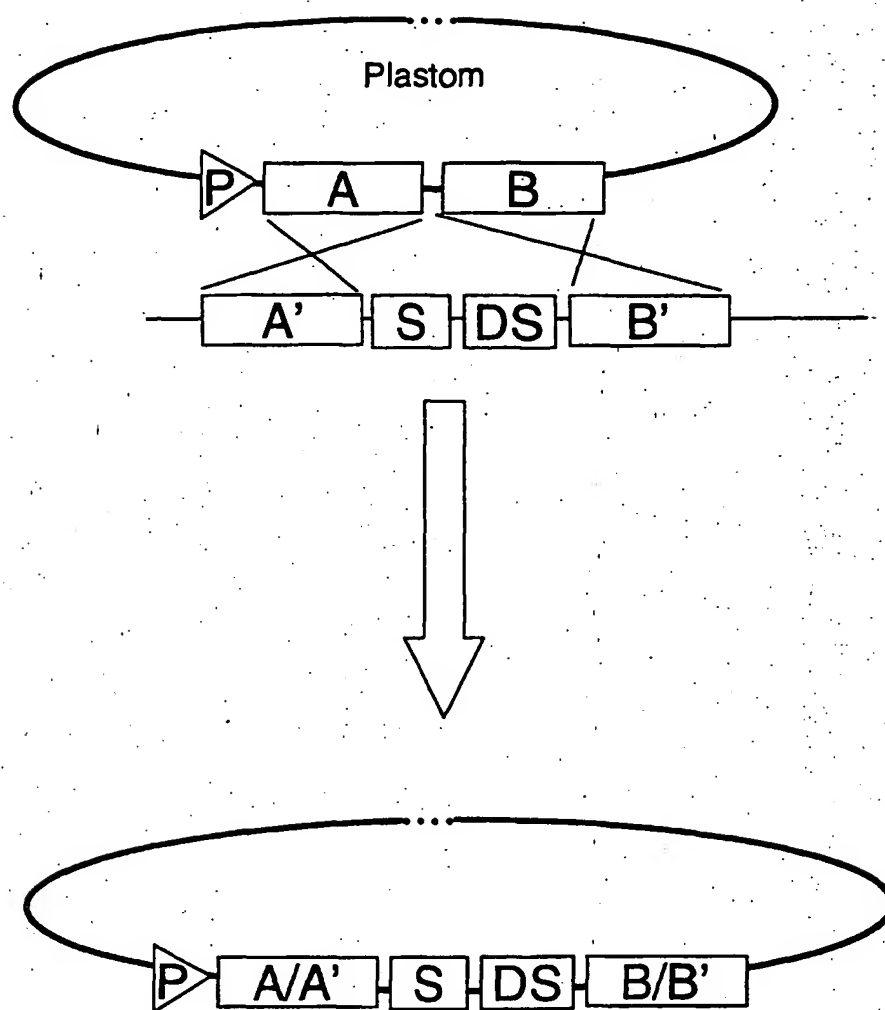


Fig. 3

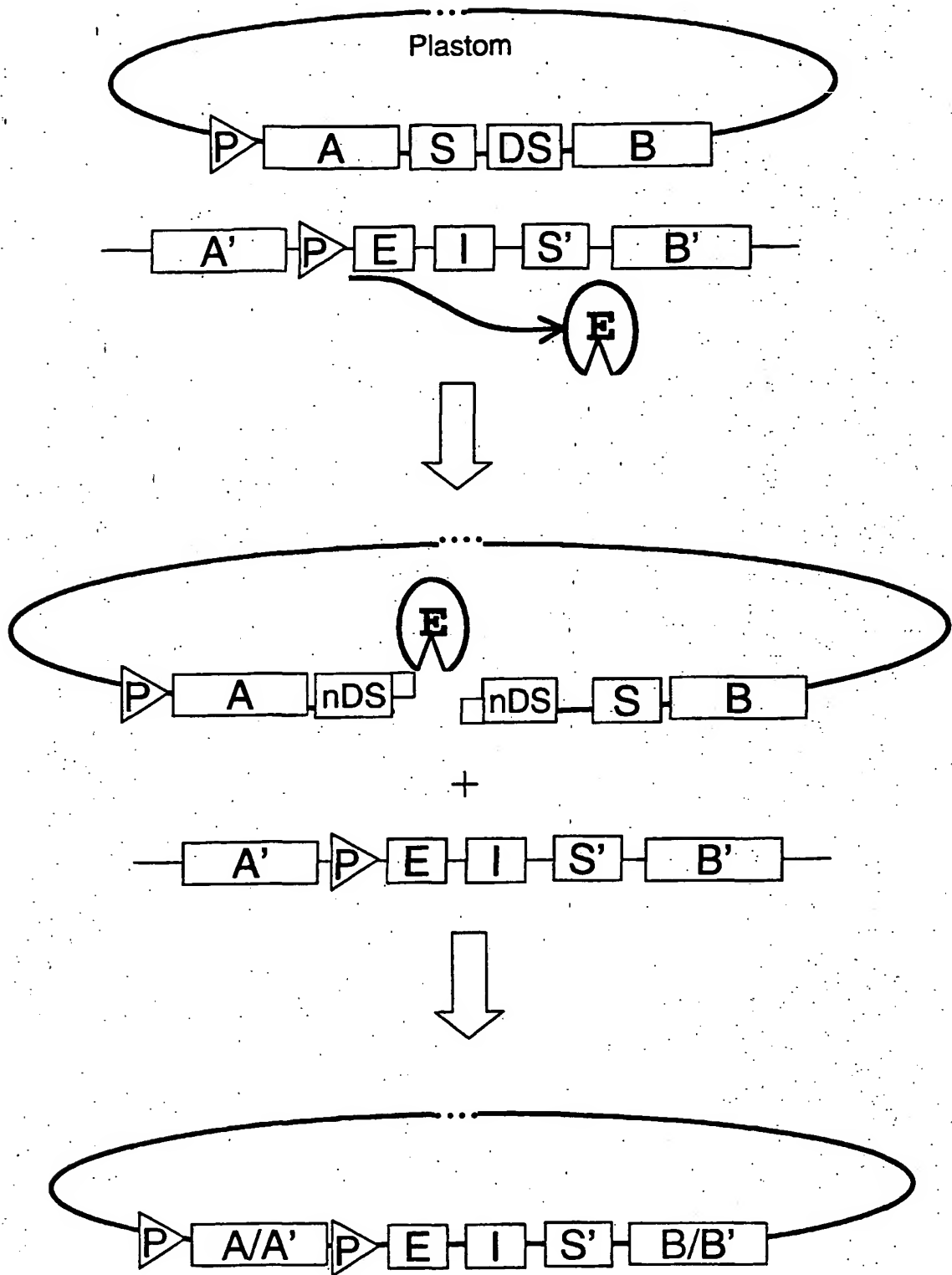


Fig. 4A

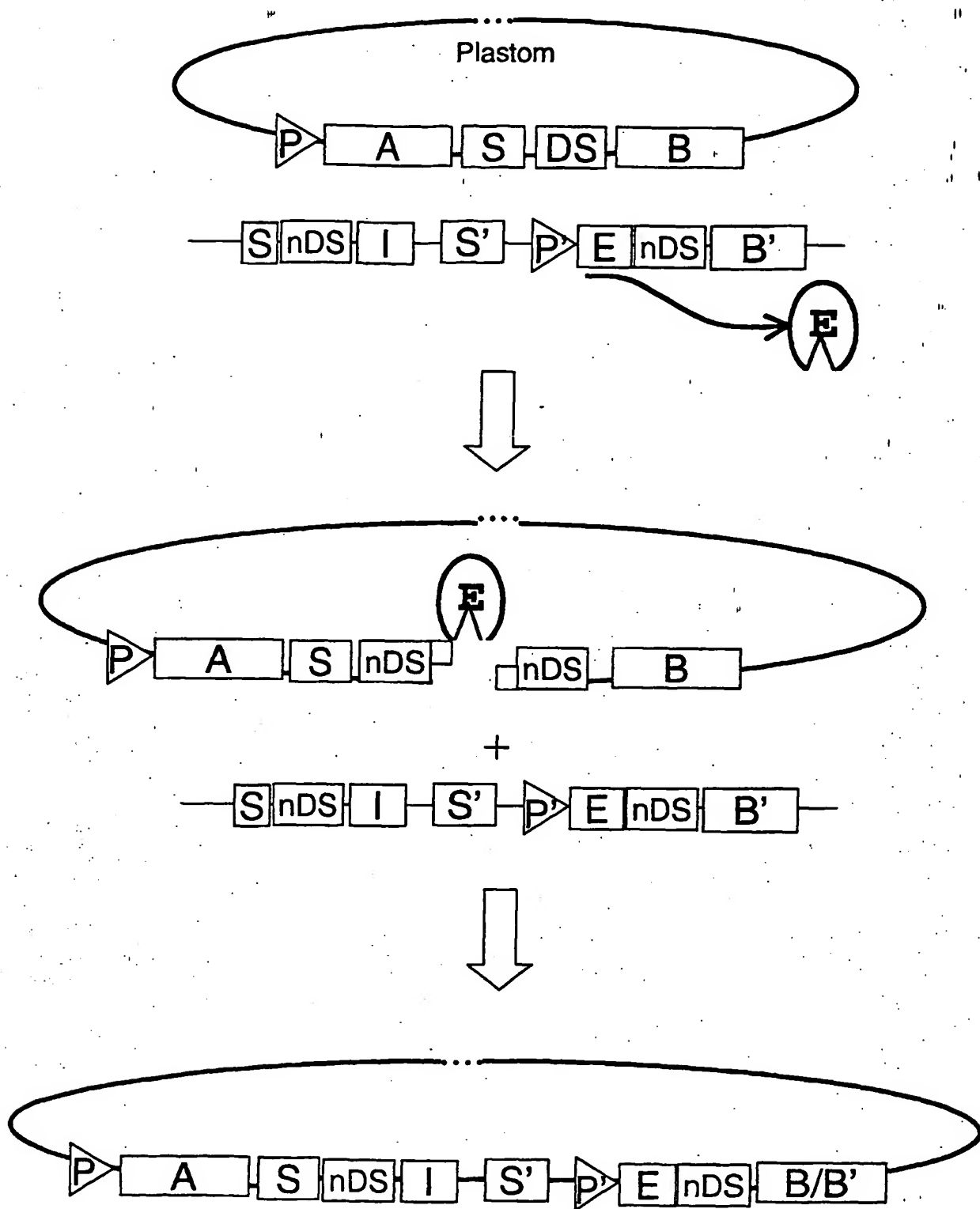


Fig. 4B

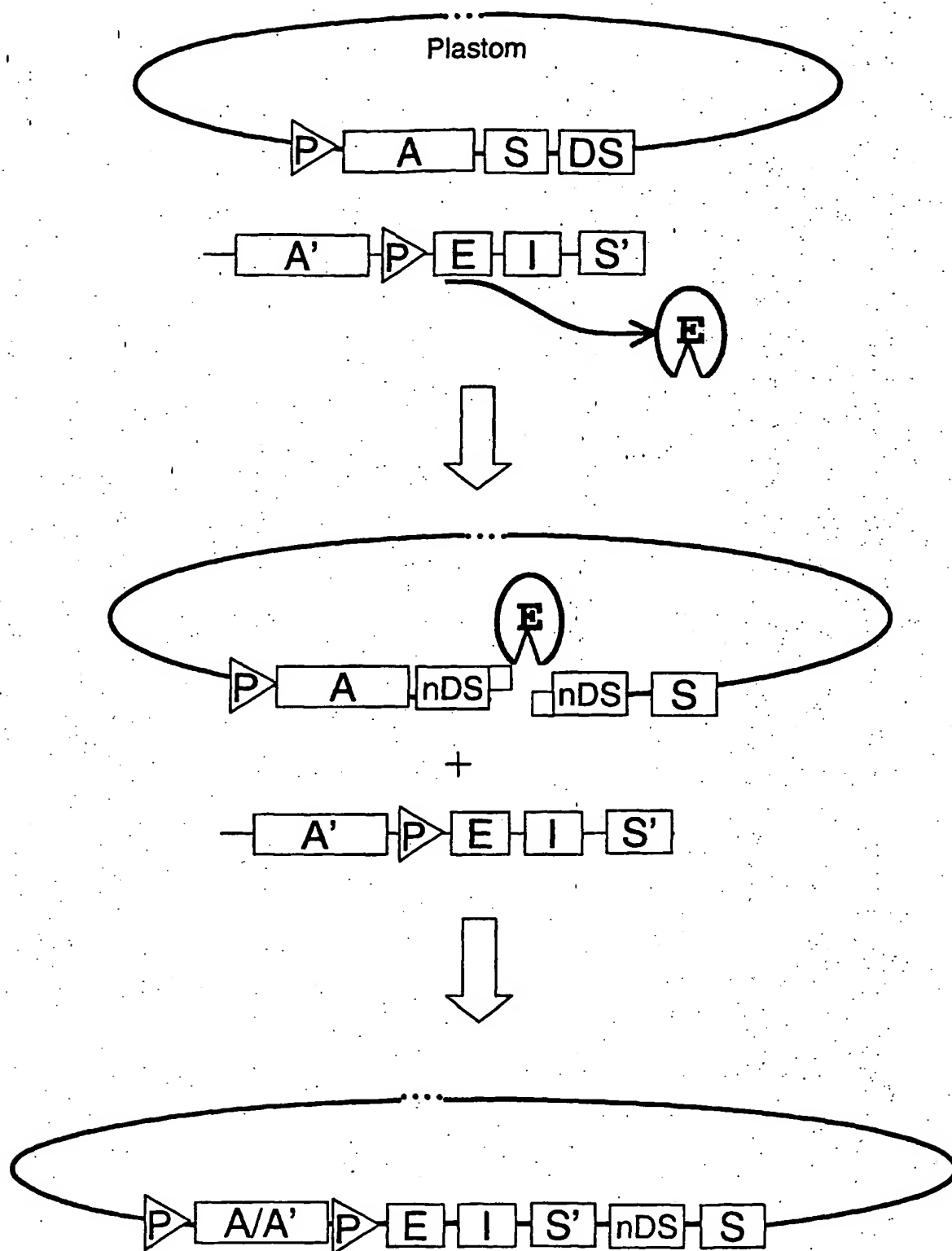


Fig. 4C

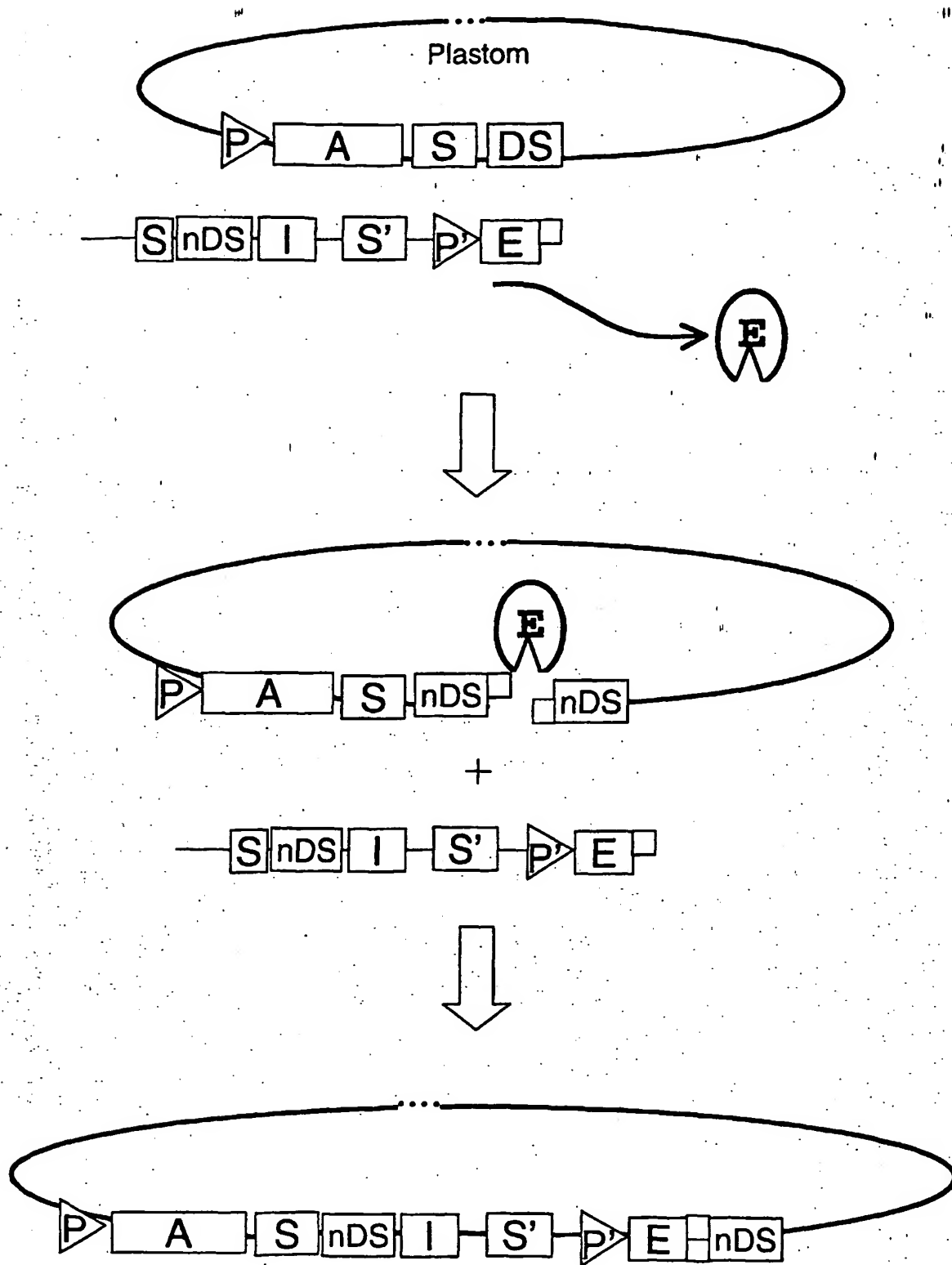


Fig. 4D

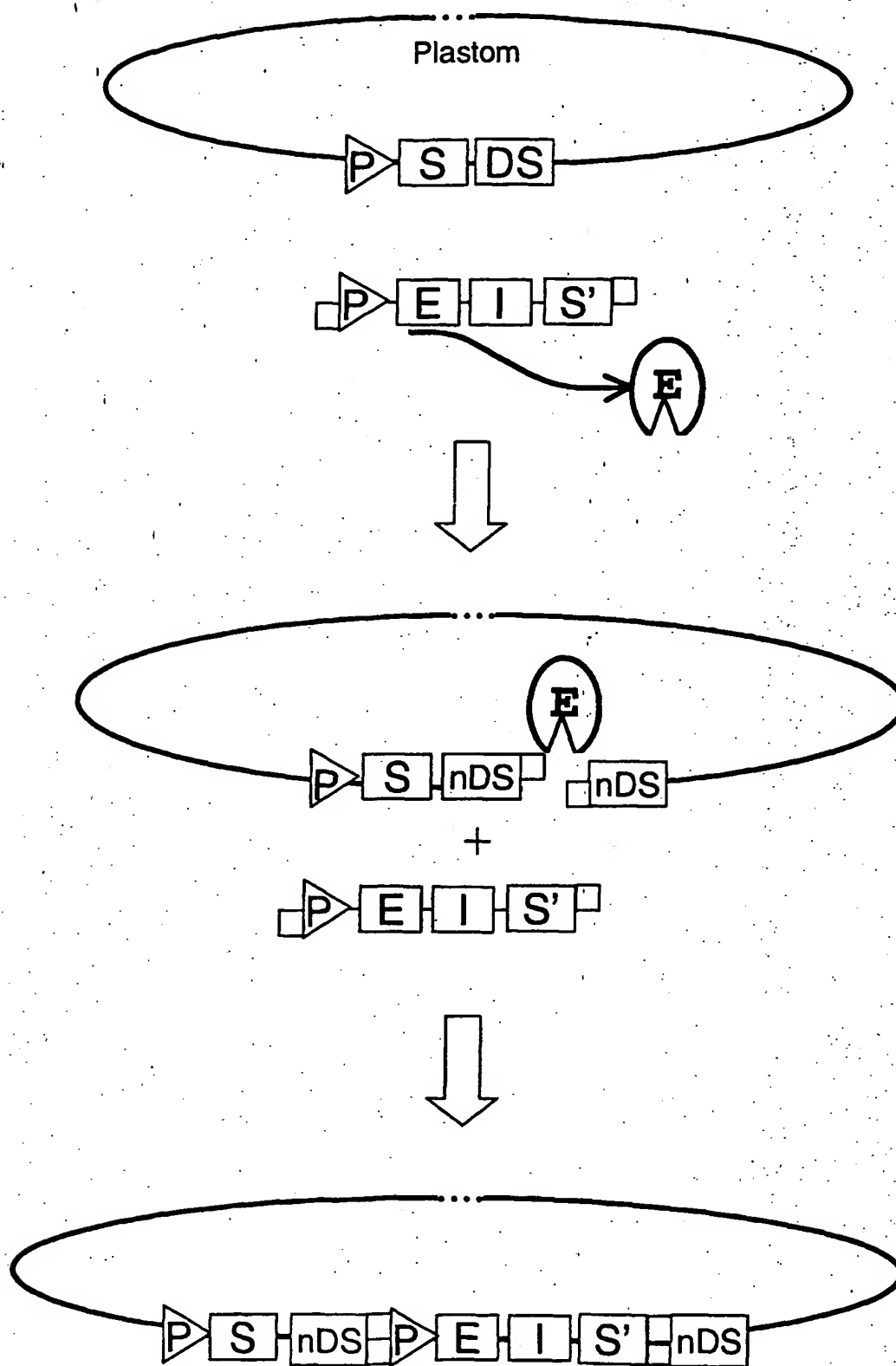


Fig. 4E

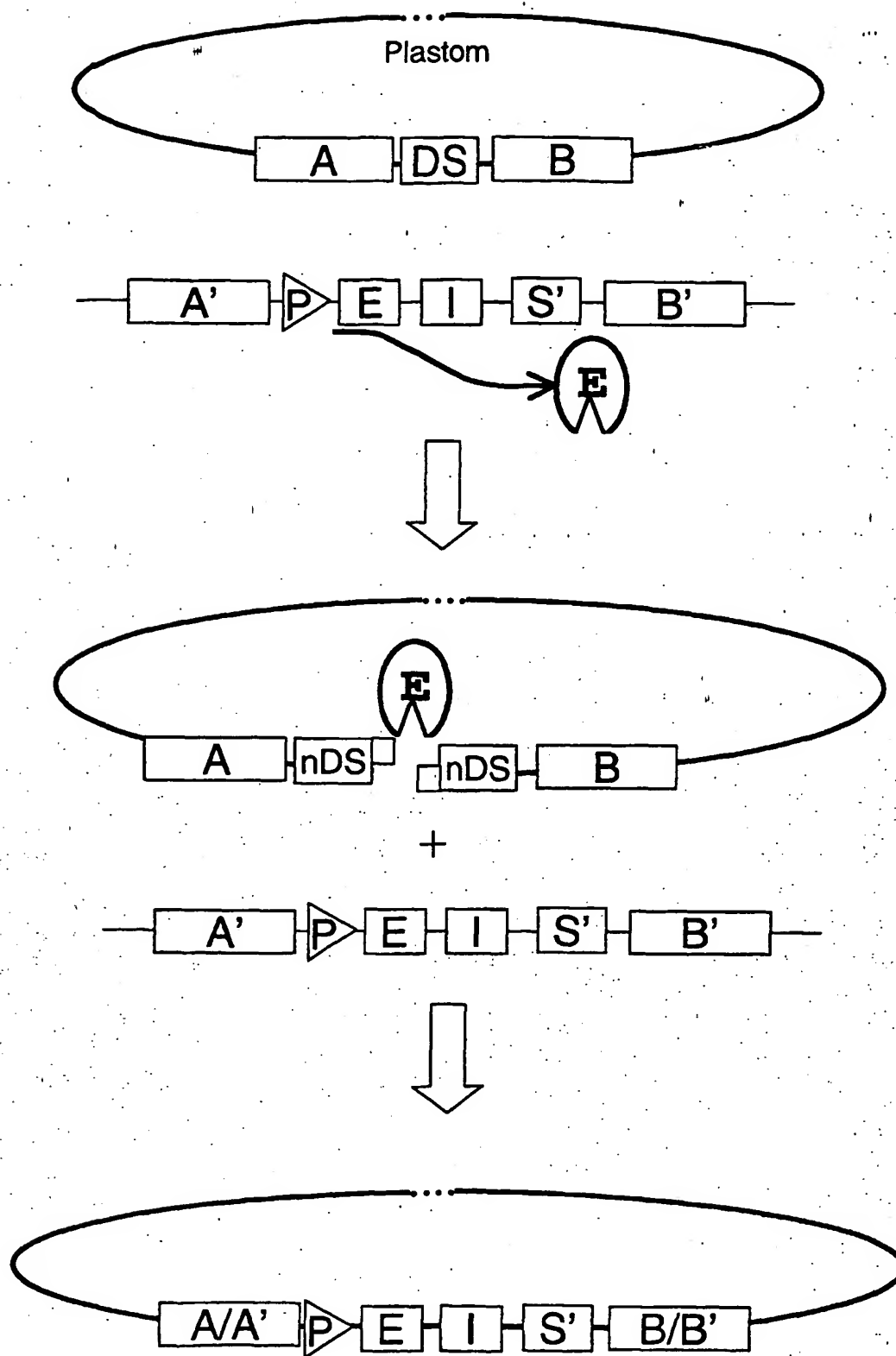


Fig. 5A

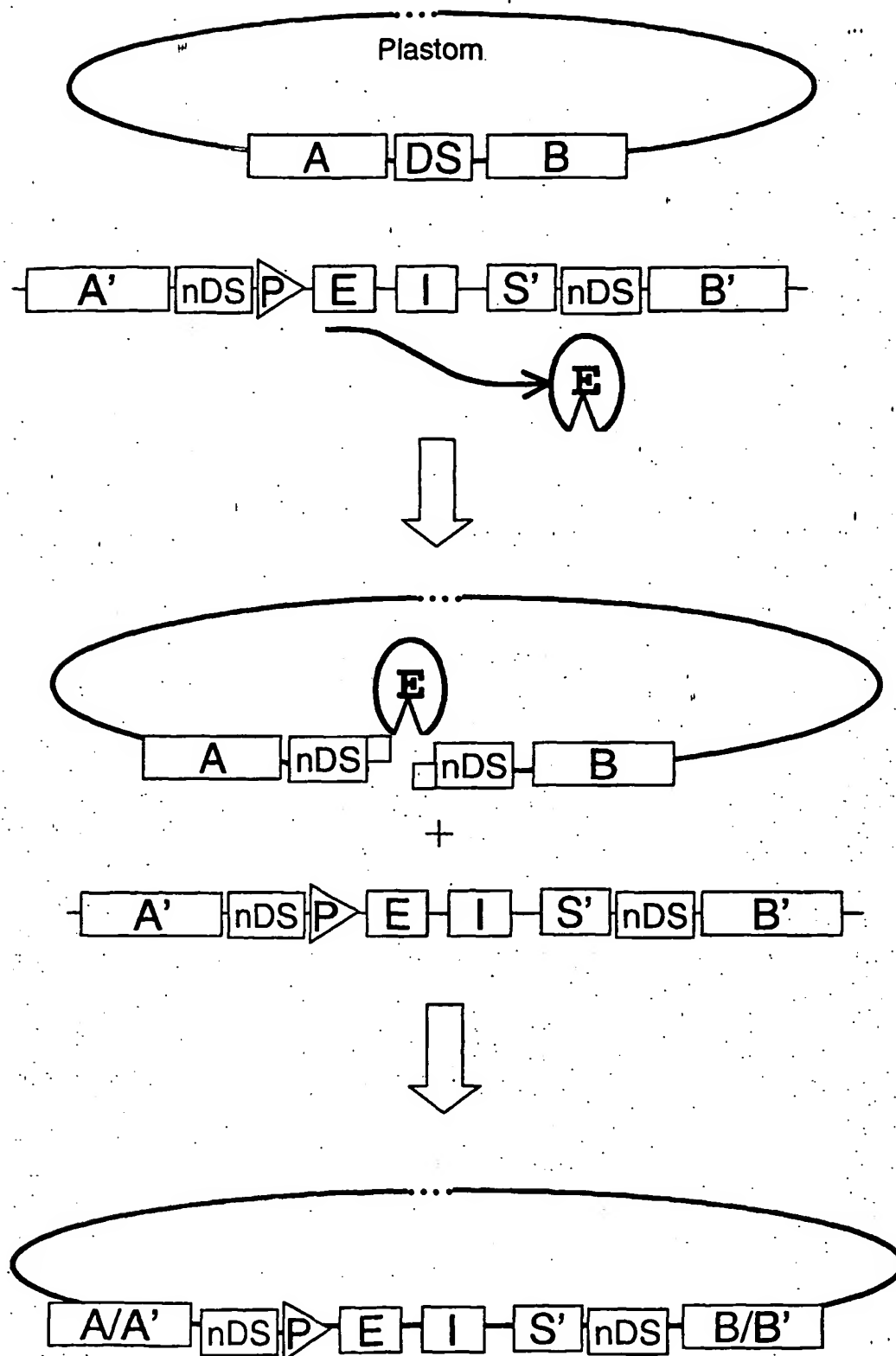


Fig. 5B

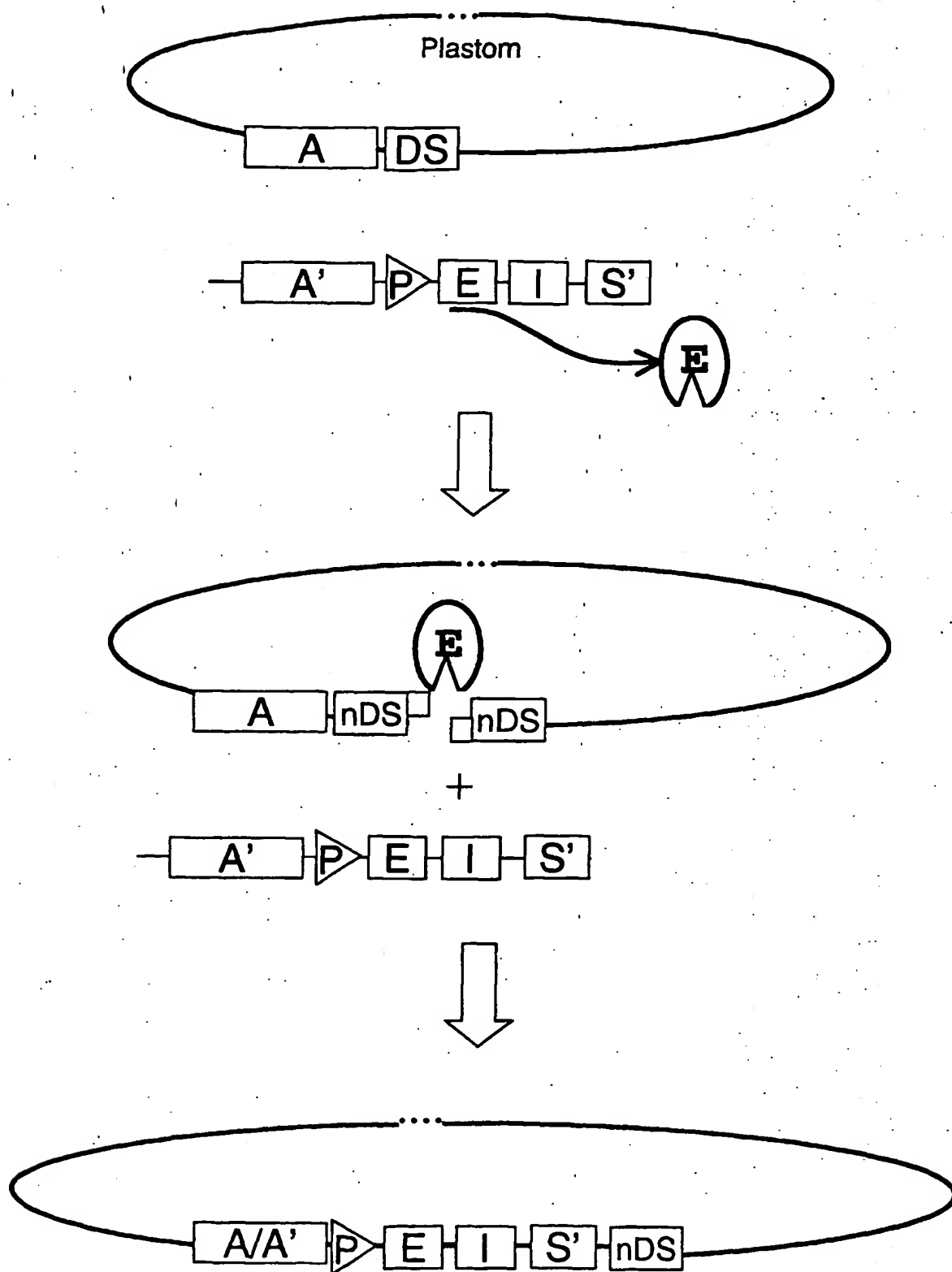


Fig. 5C

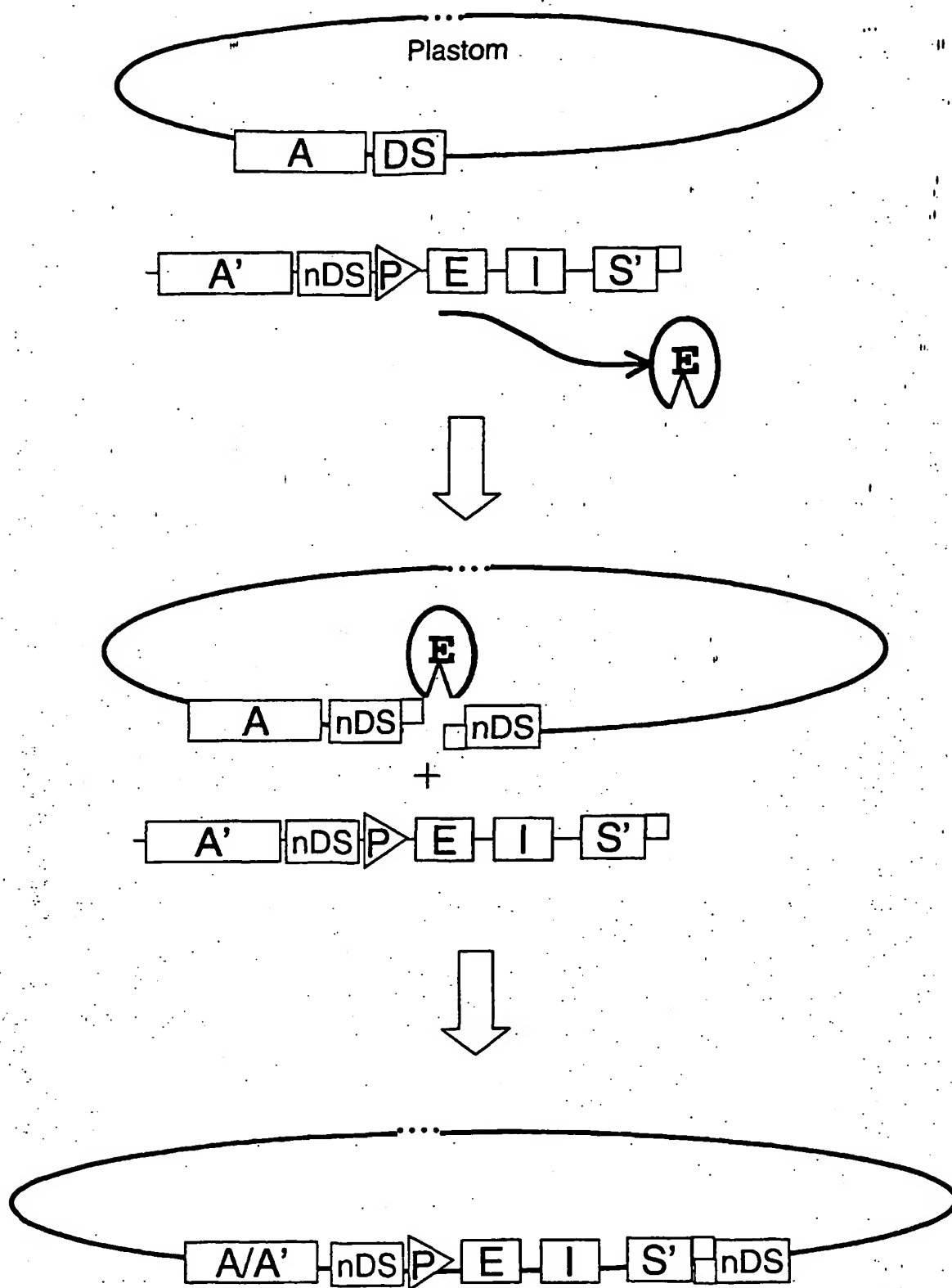


Fig. 5D

17/32

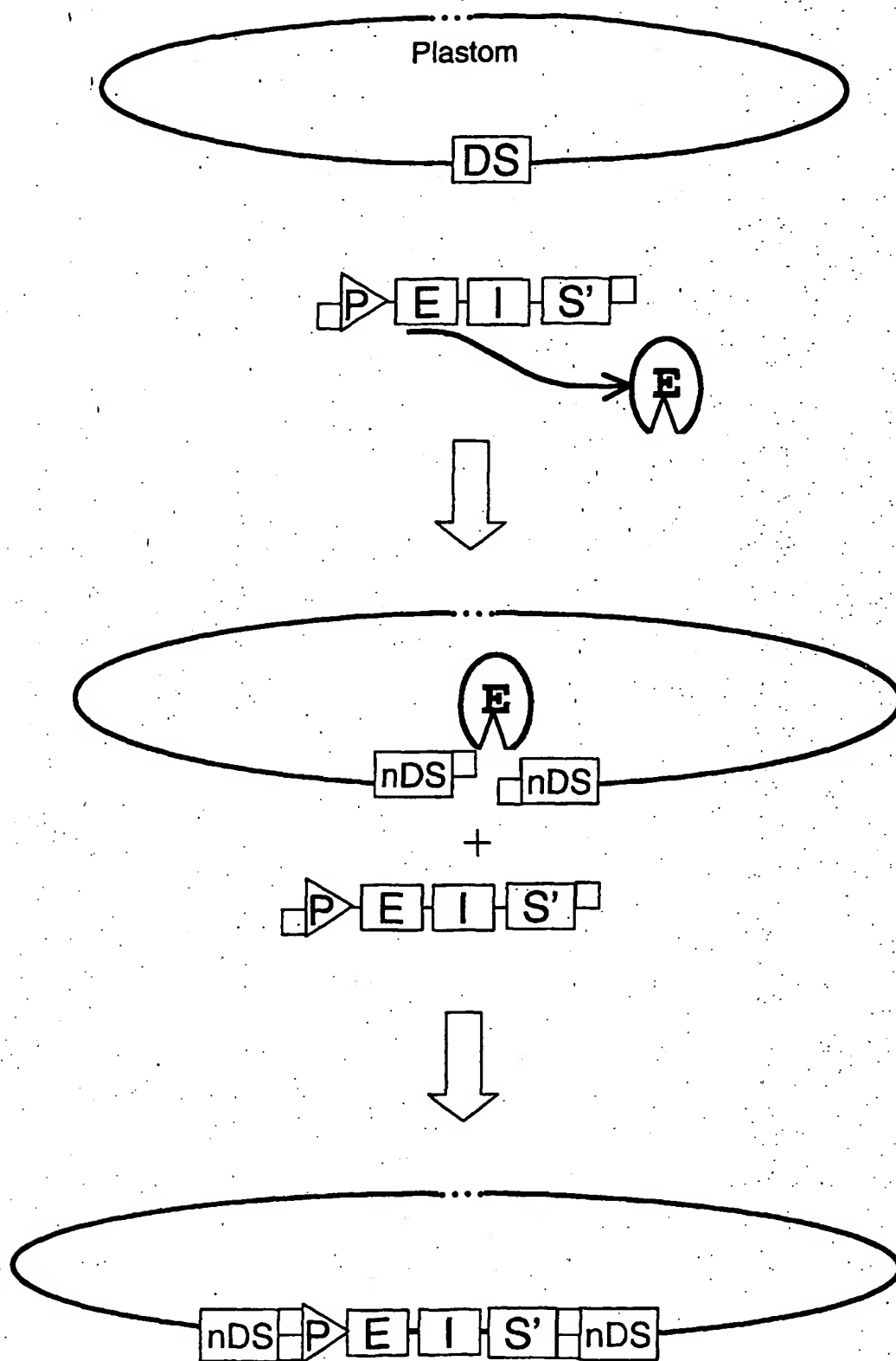


Fig. 5E

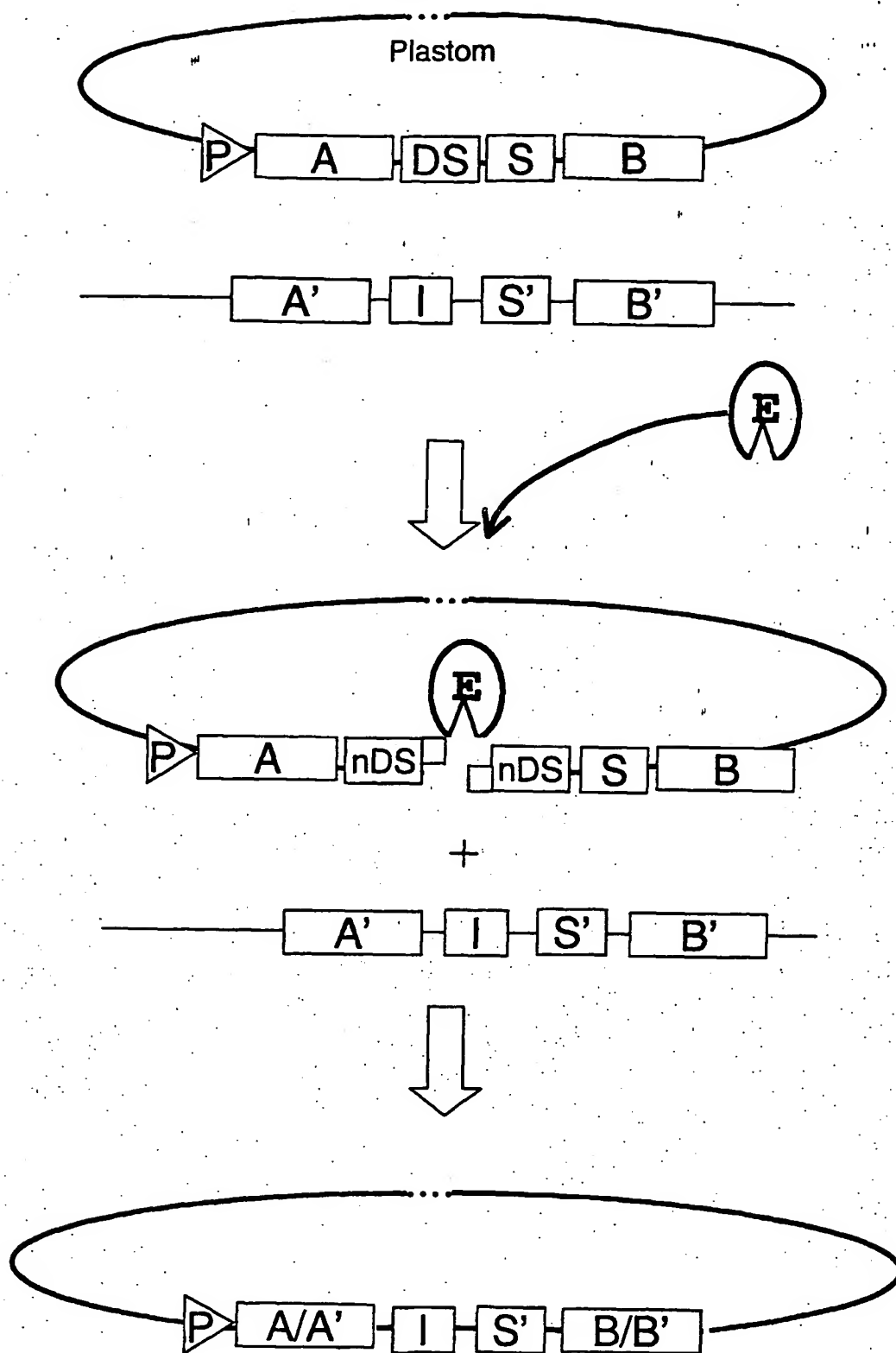


Fig. 6A

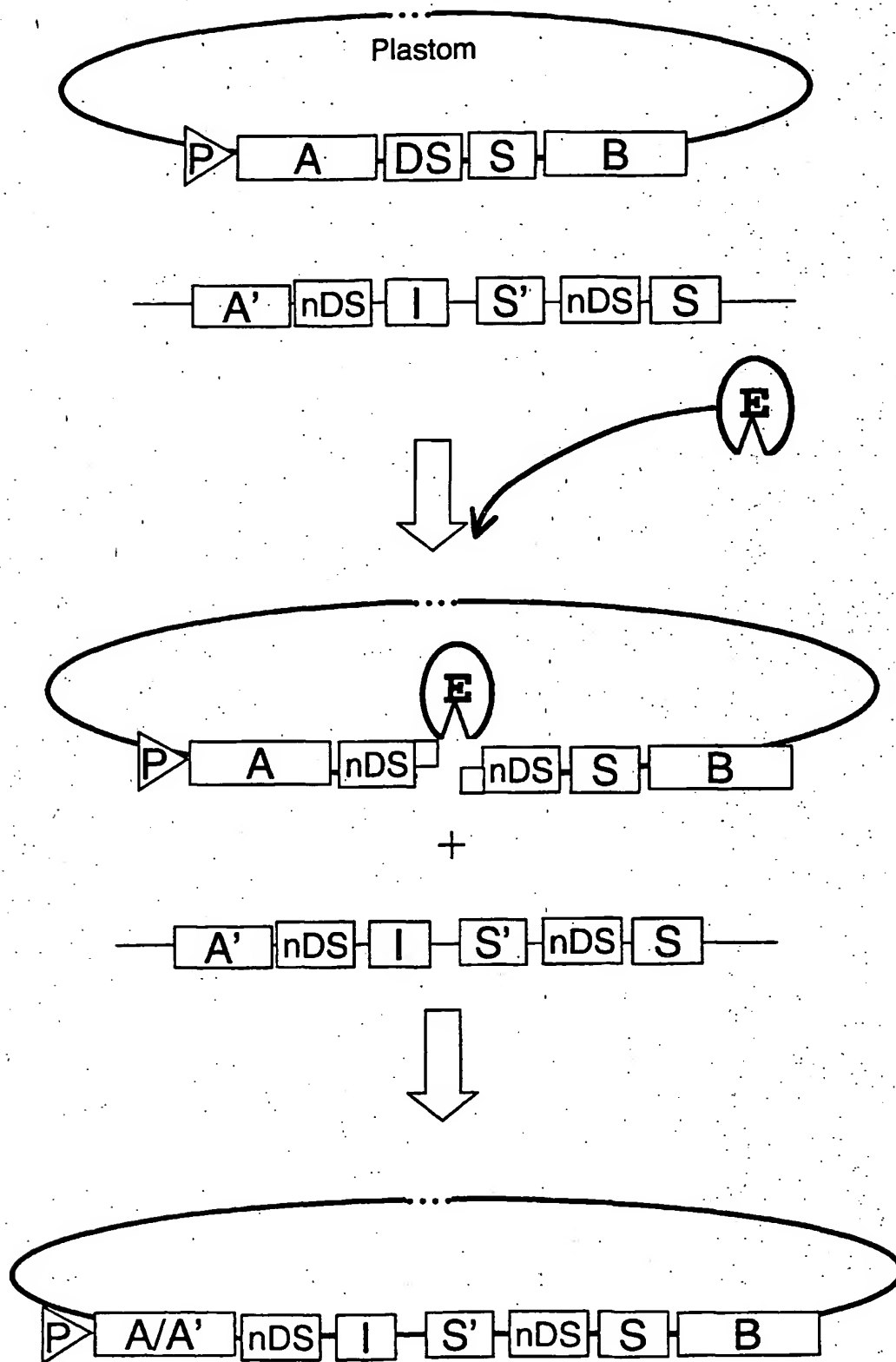


Fig. 6B

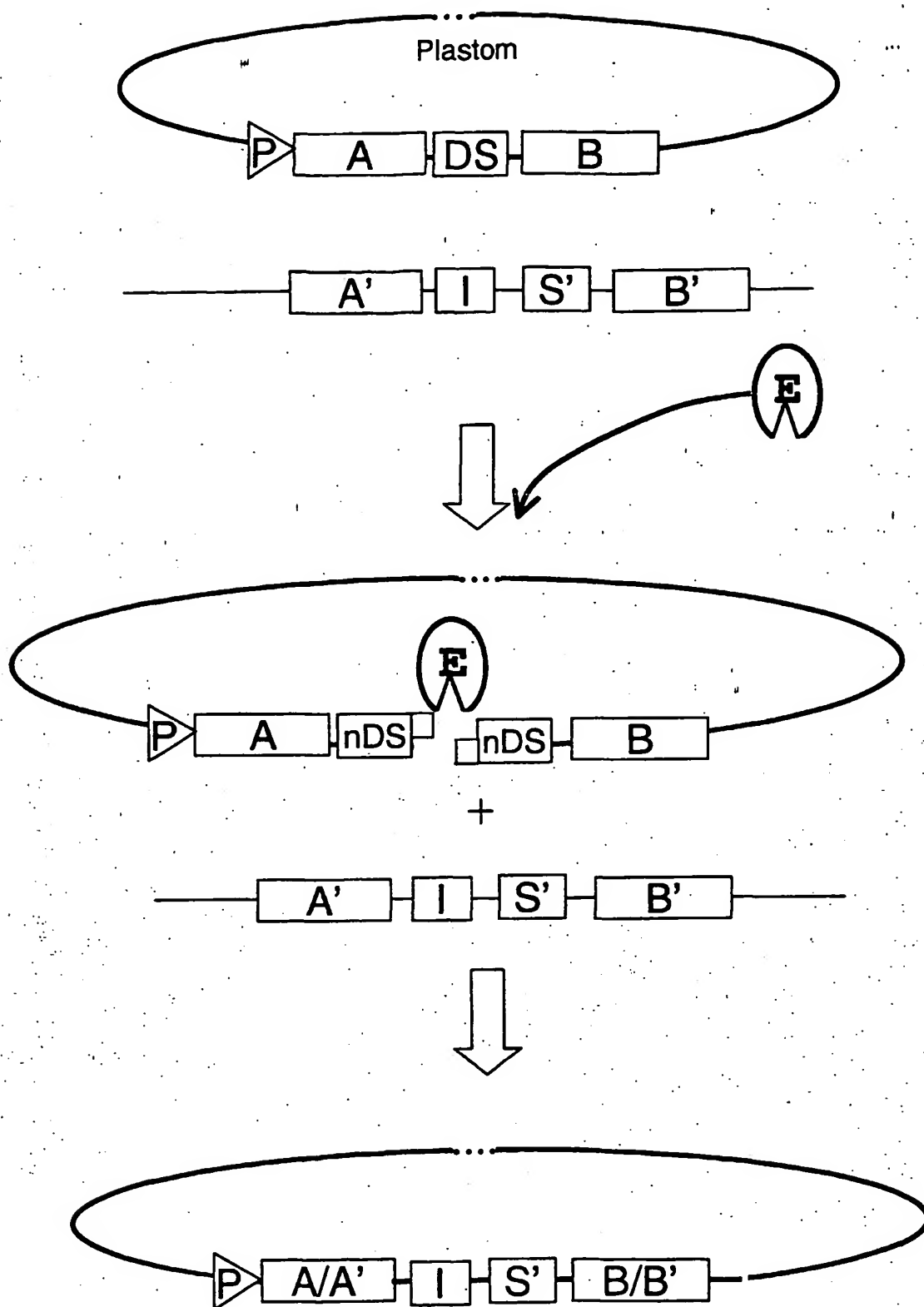


Fig. 6C

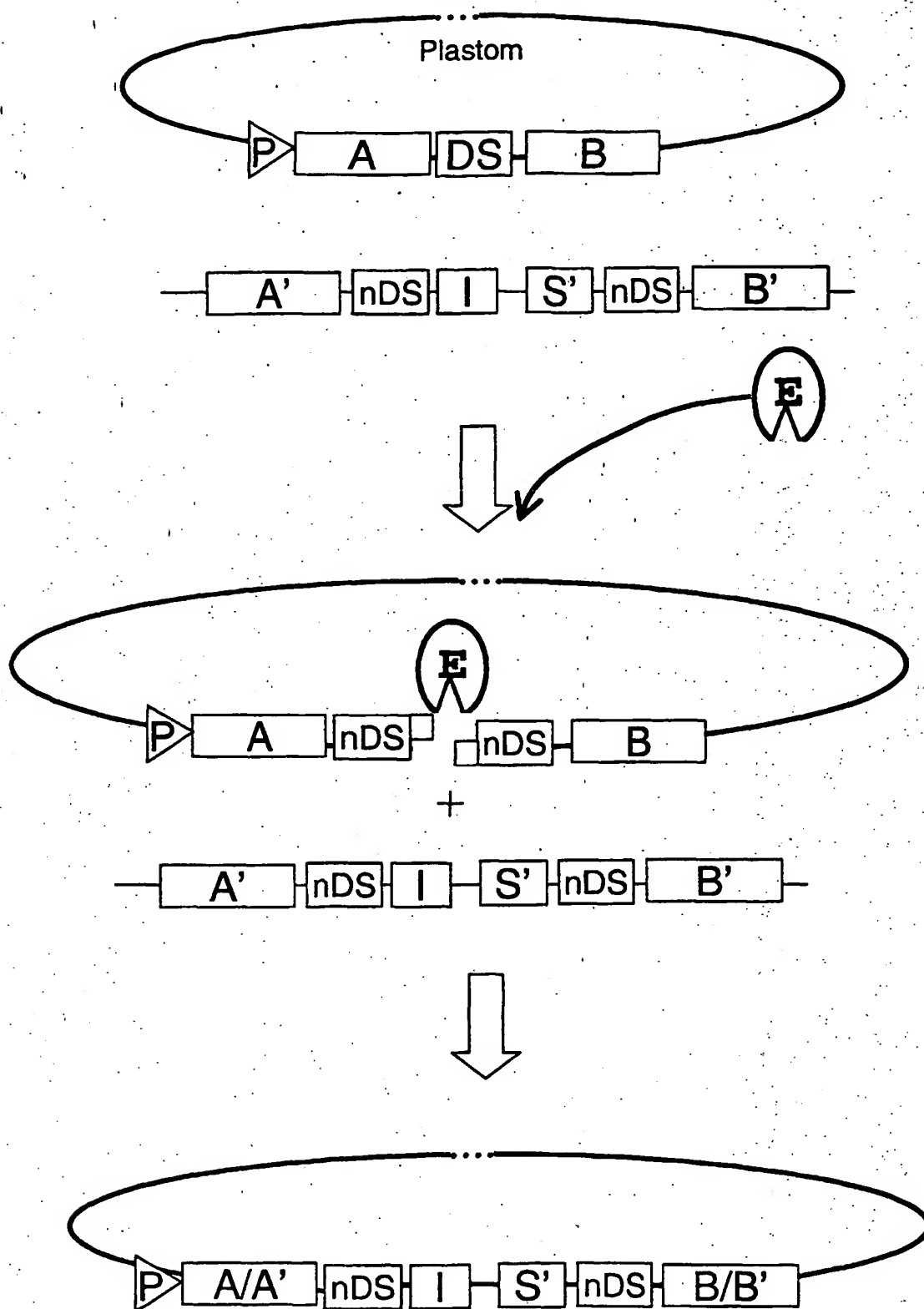


Fig. 6D

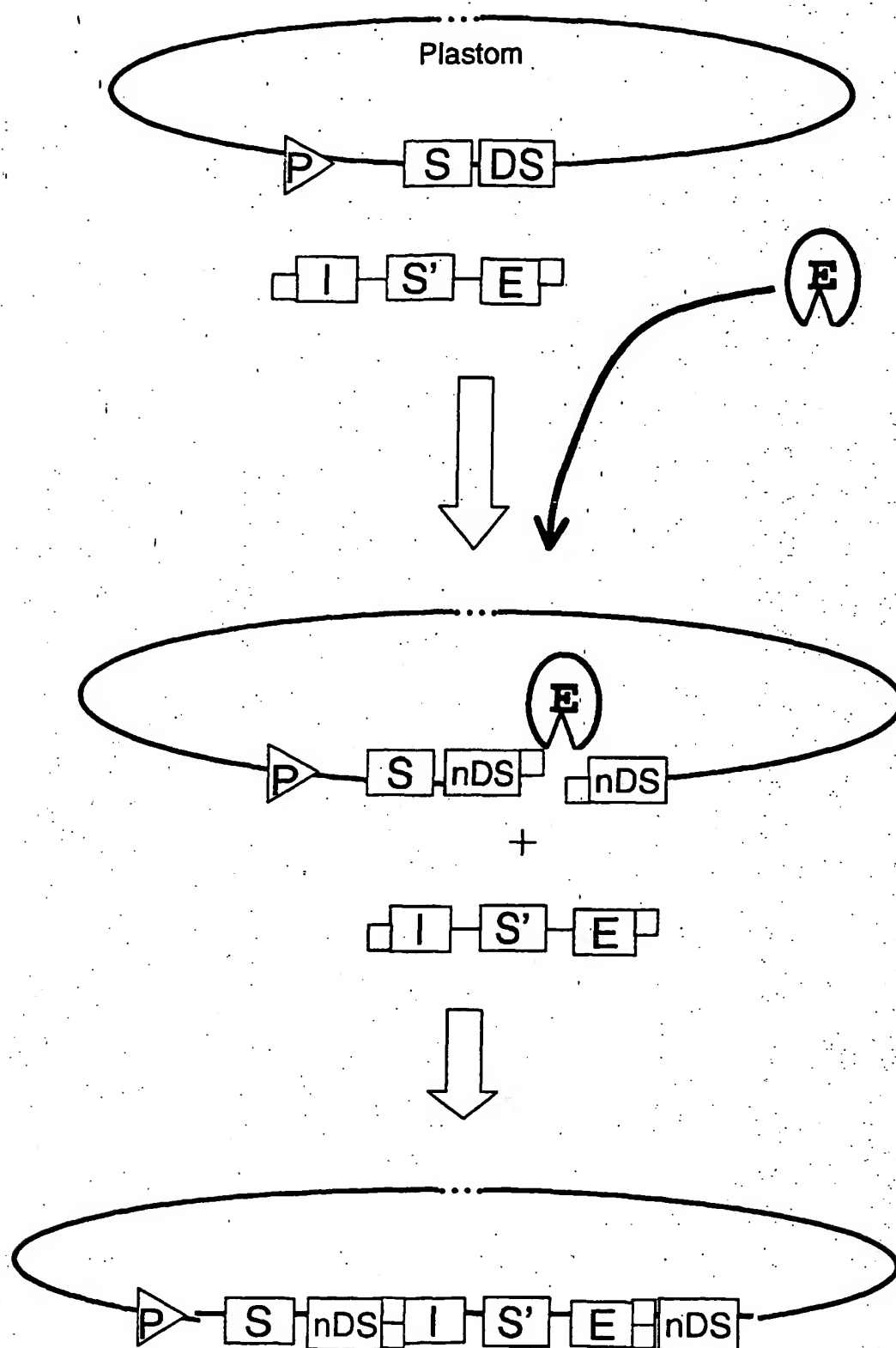


Fig. 6E

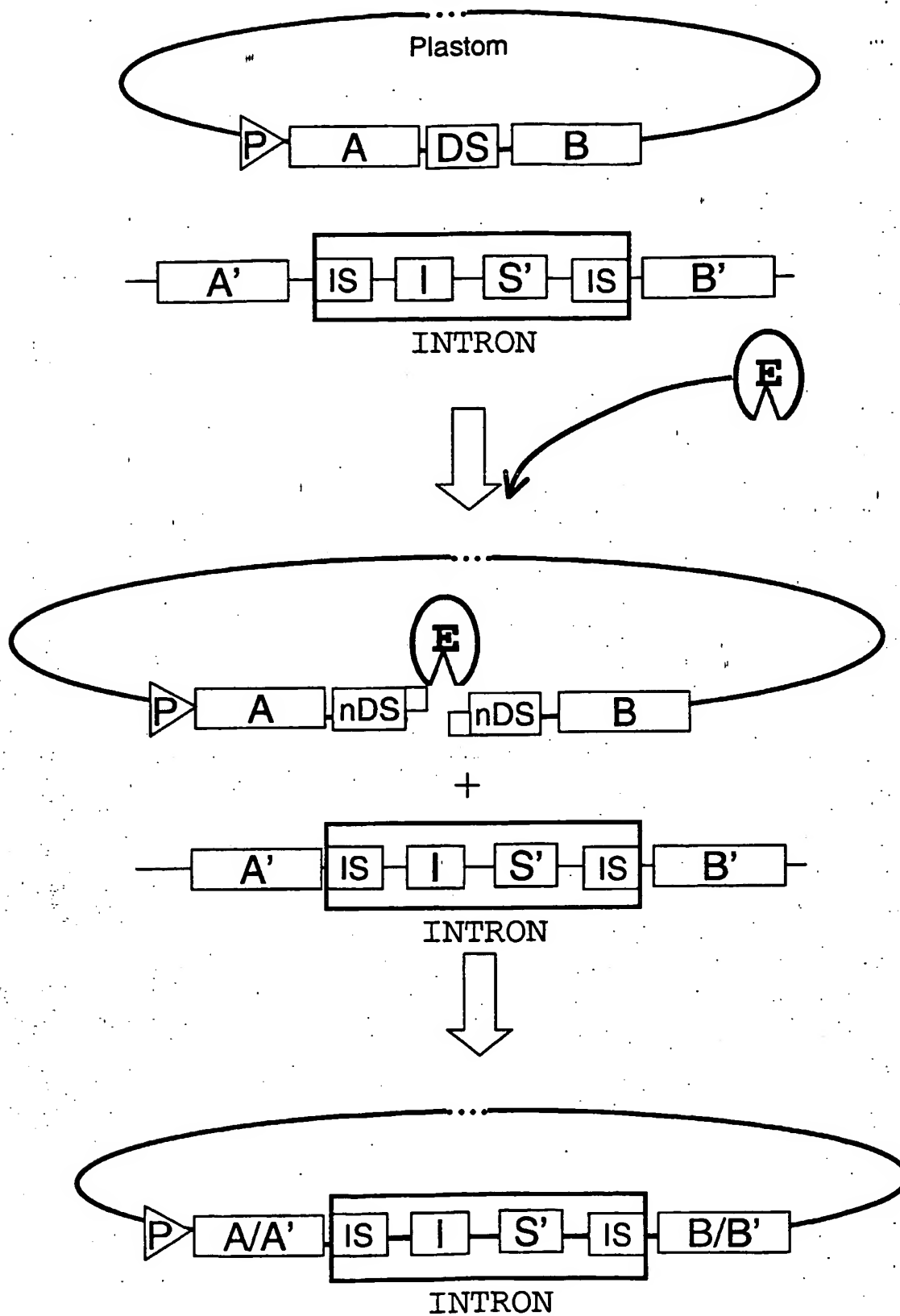


Fig. 7A

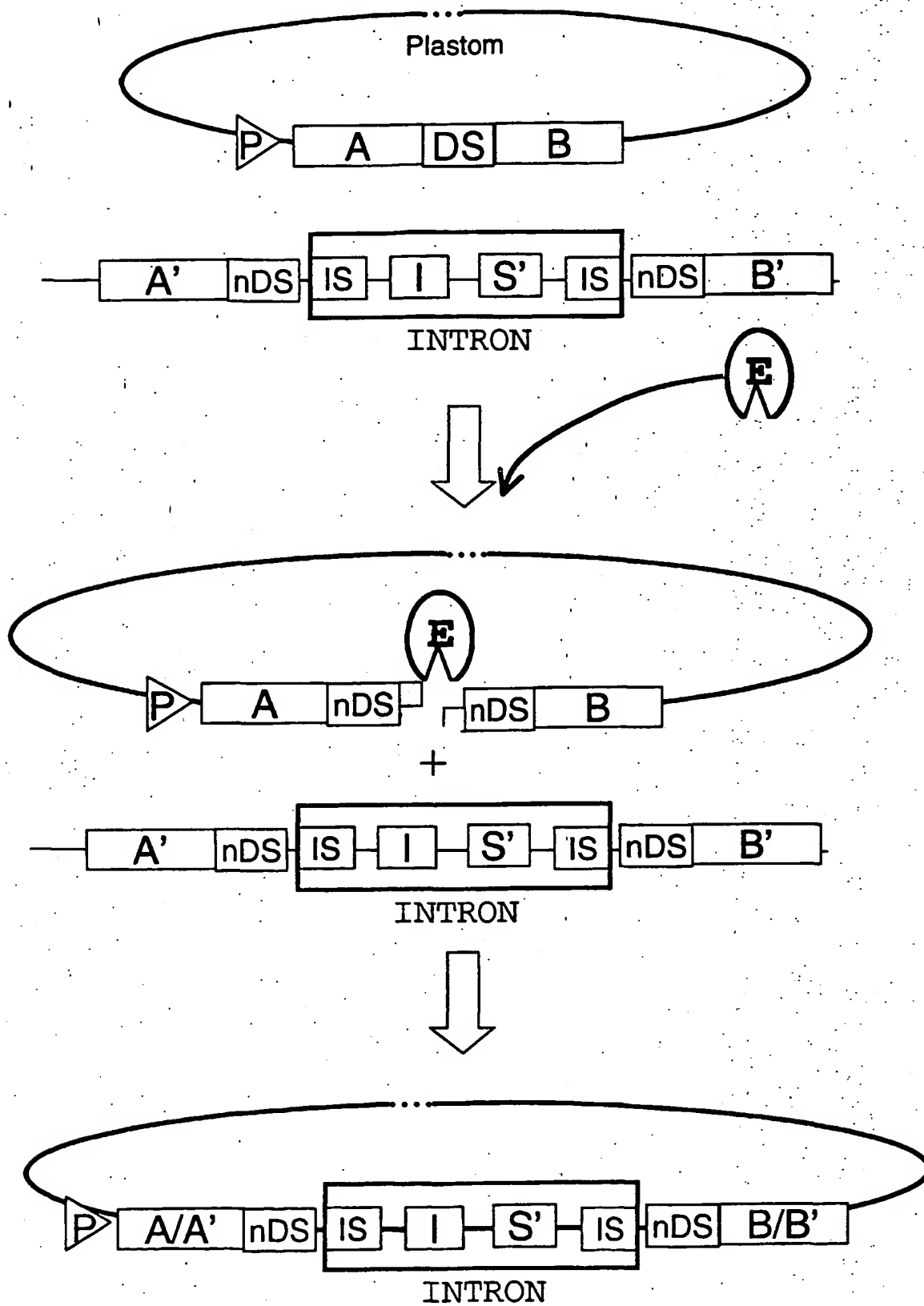


Fig. 7B

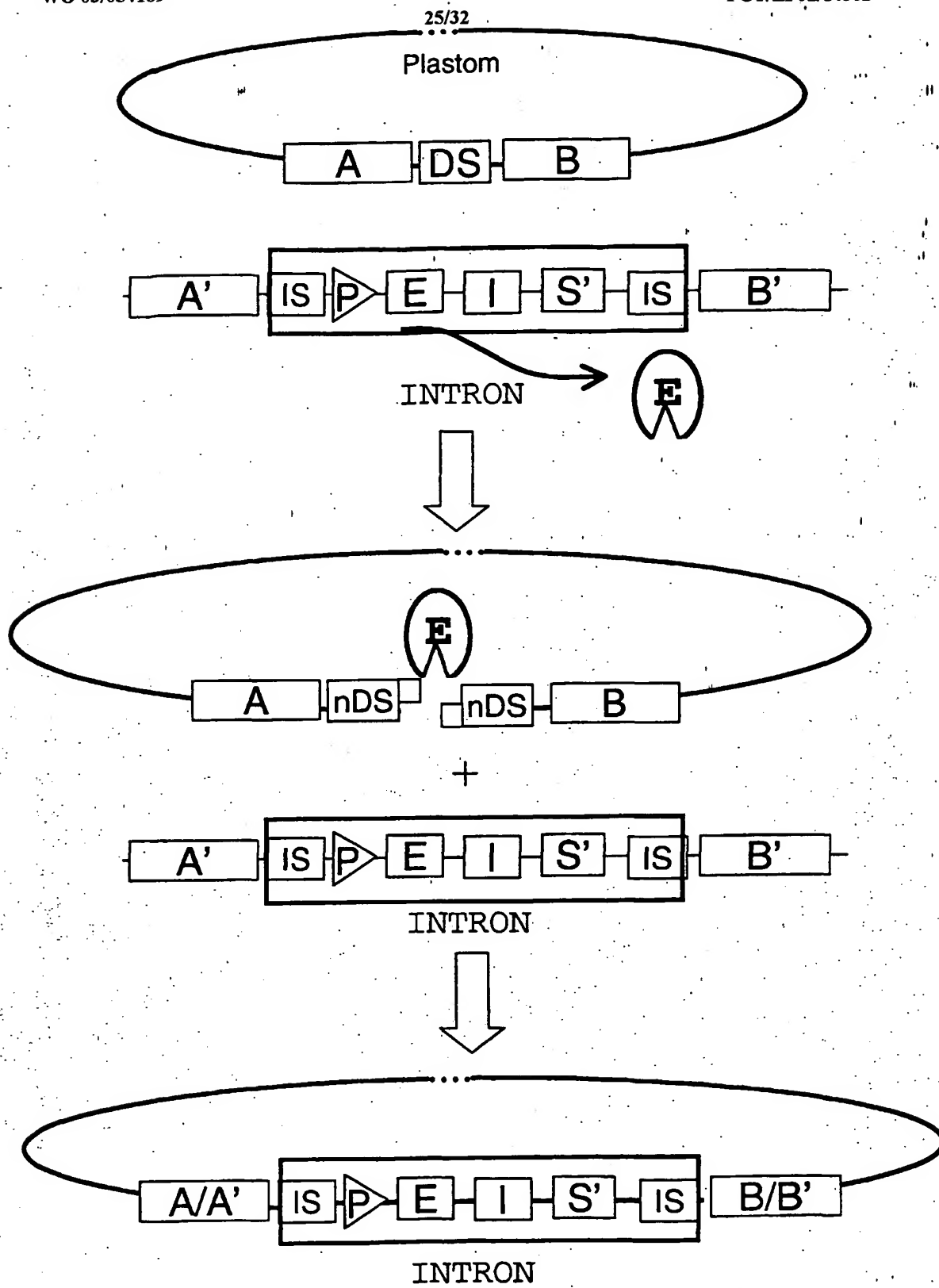


Fig. 7C

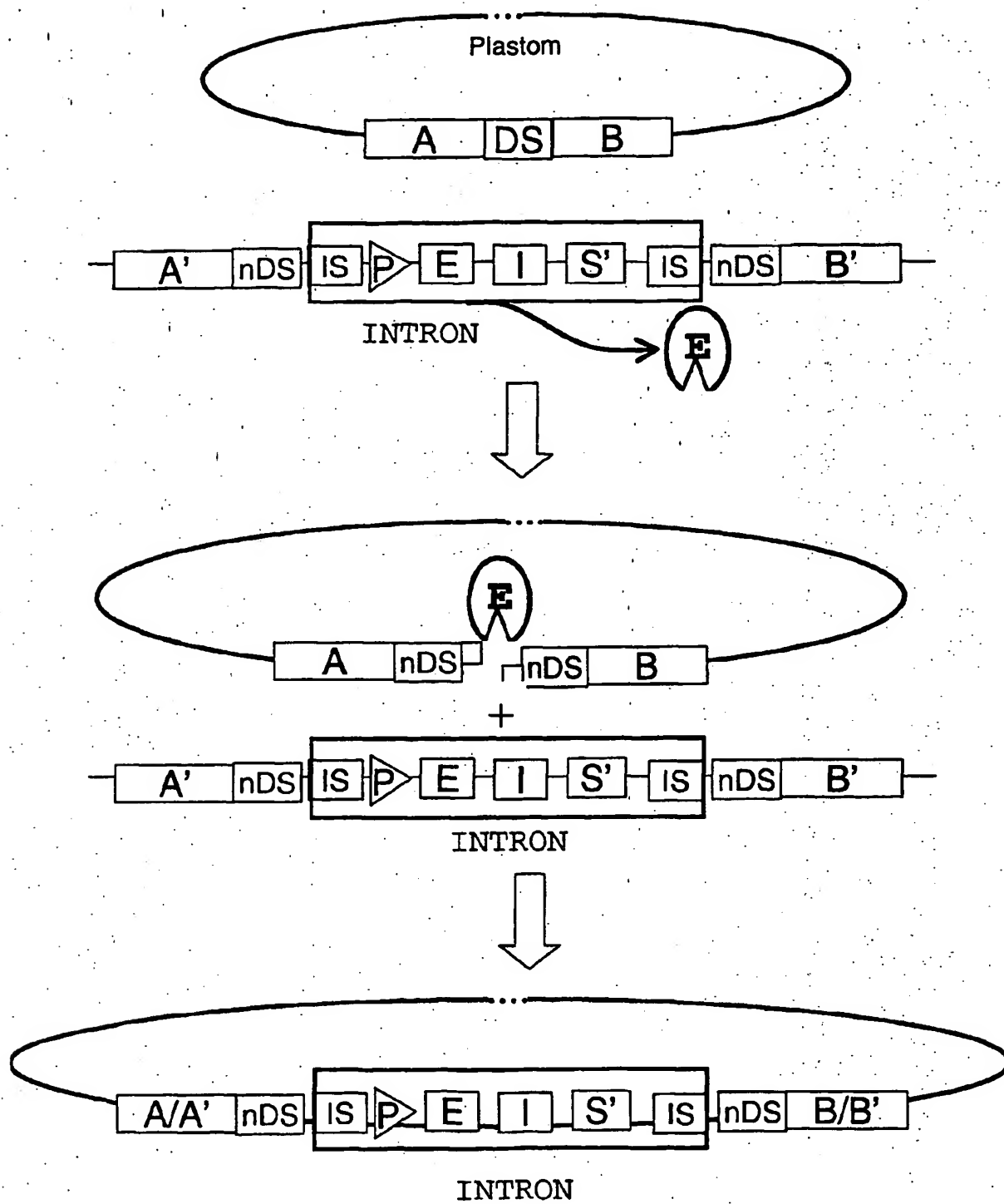


Fig. 7D

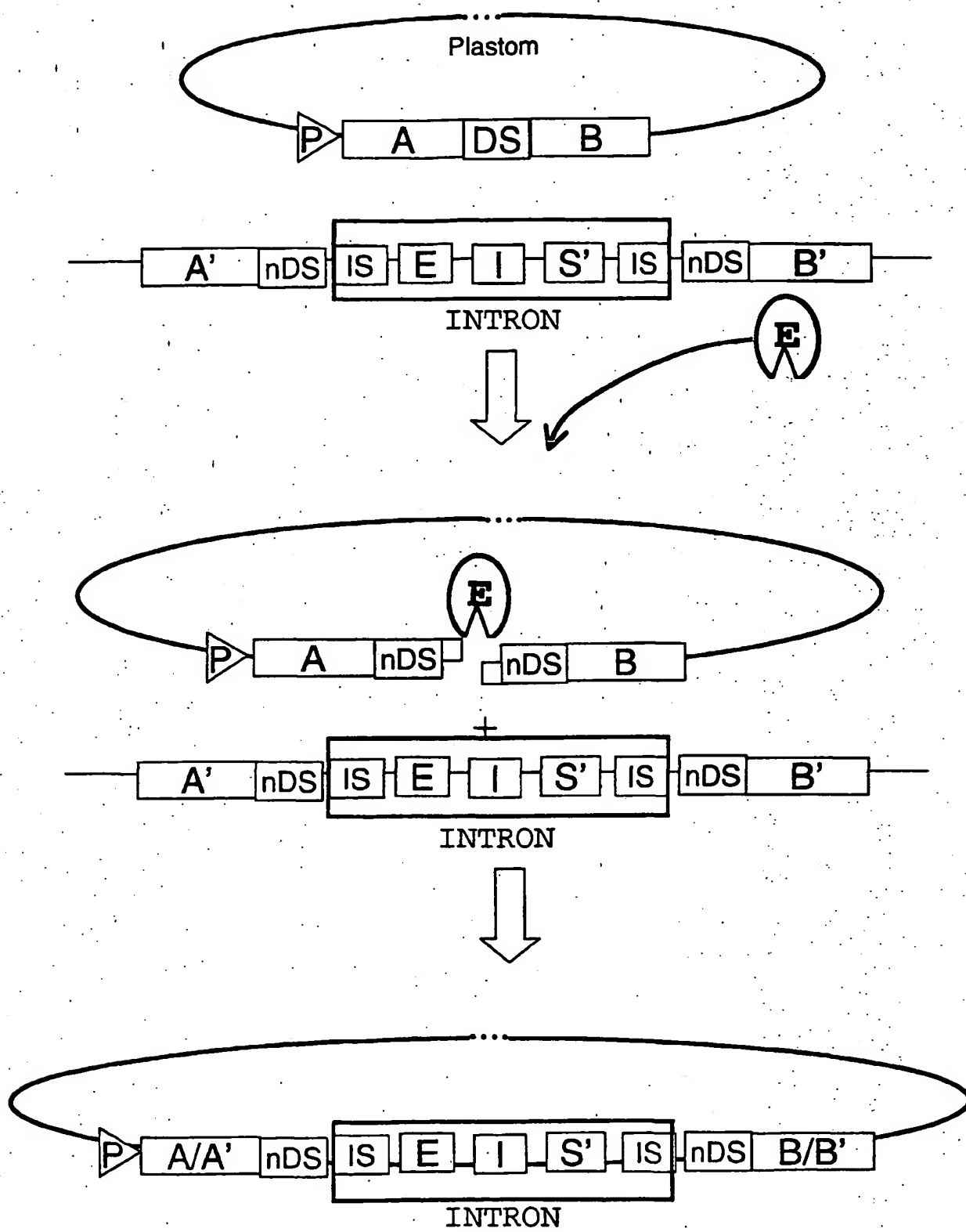


Fig. 7E

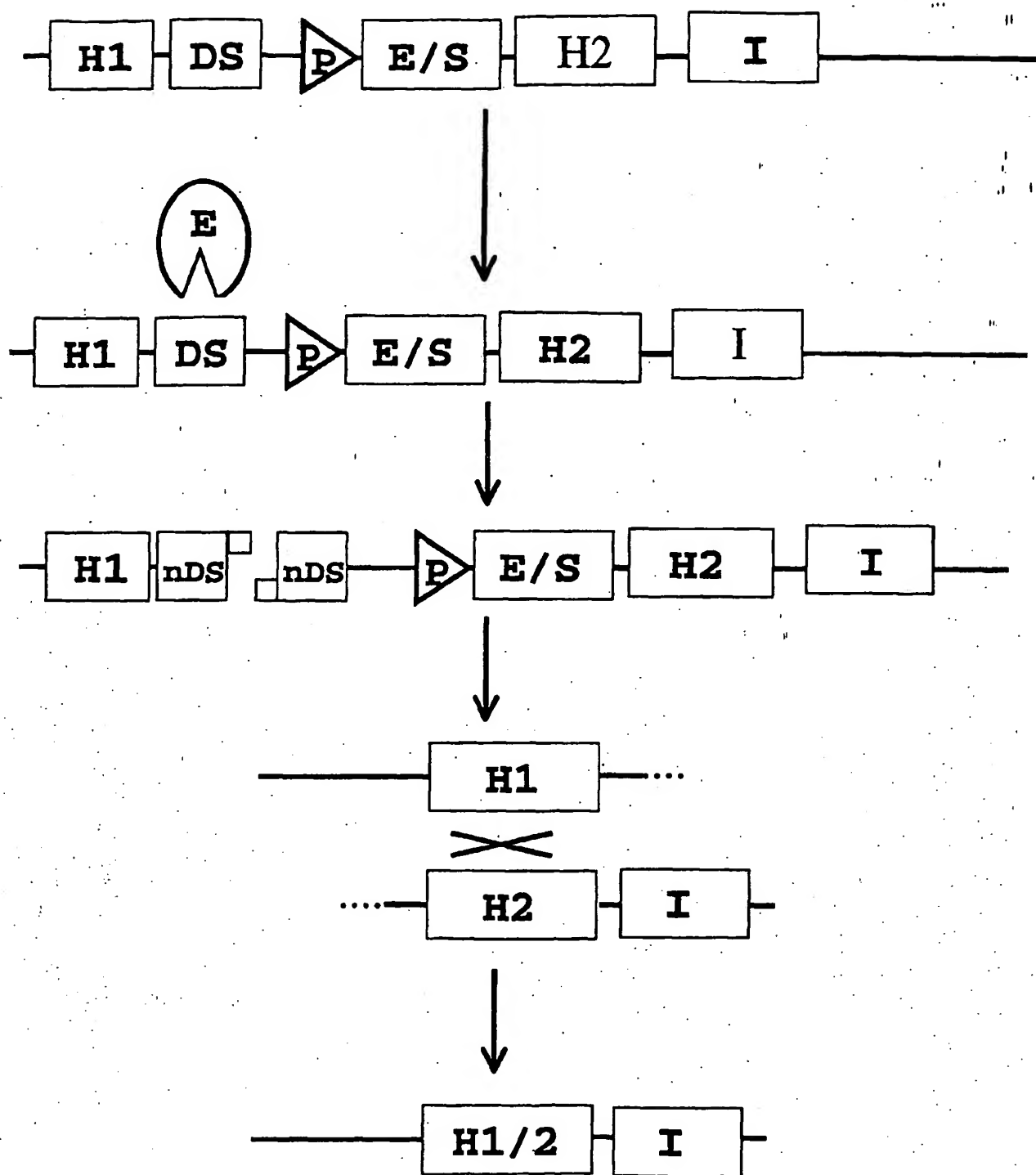
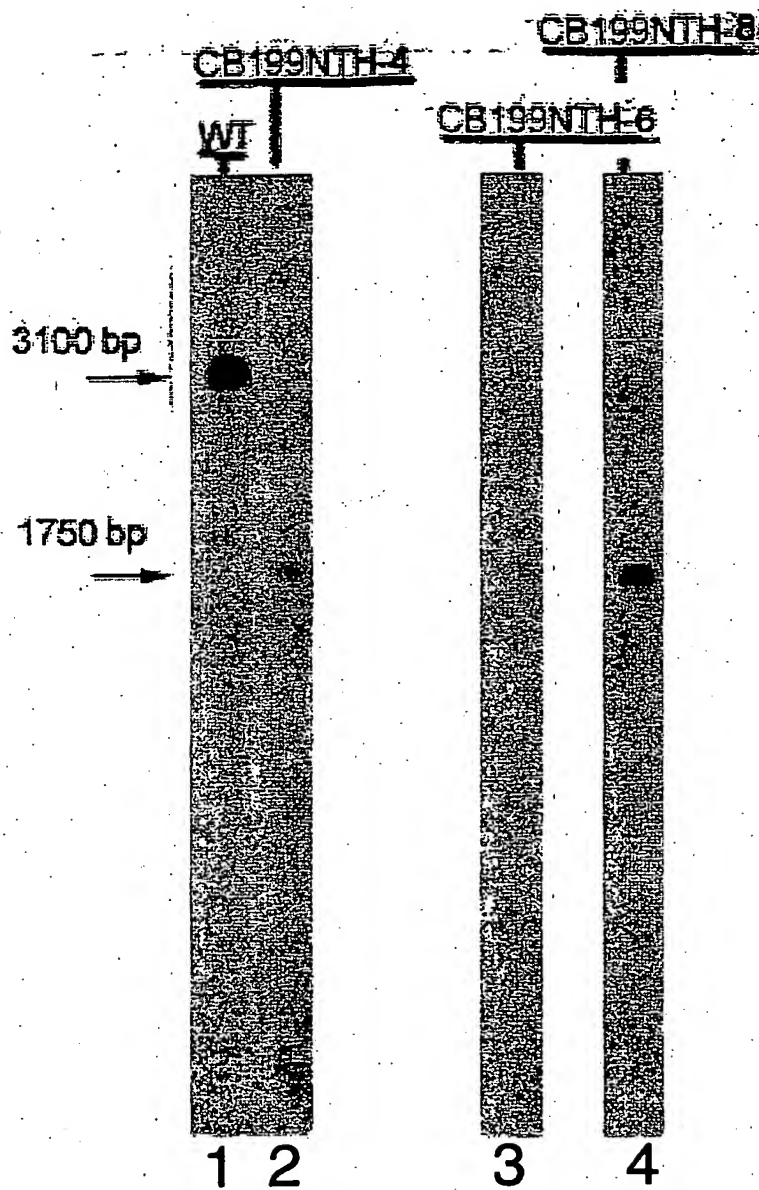
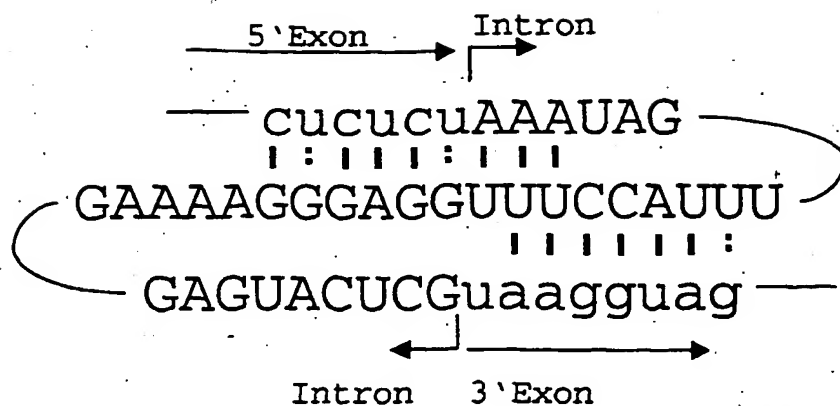


Fig. 8

**Fig. 9**

A



B

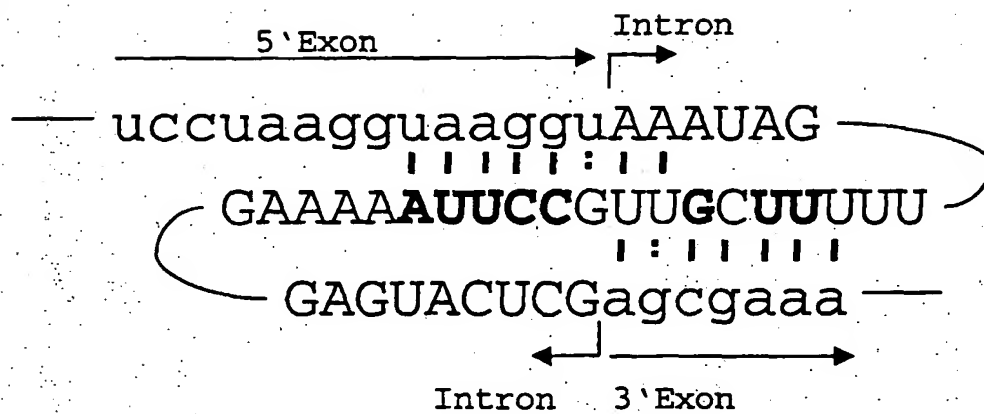


Fig. 10

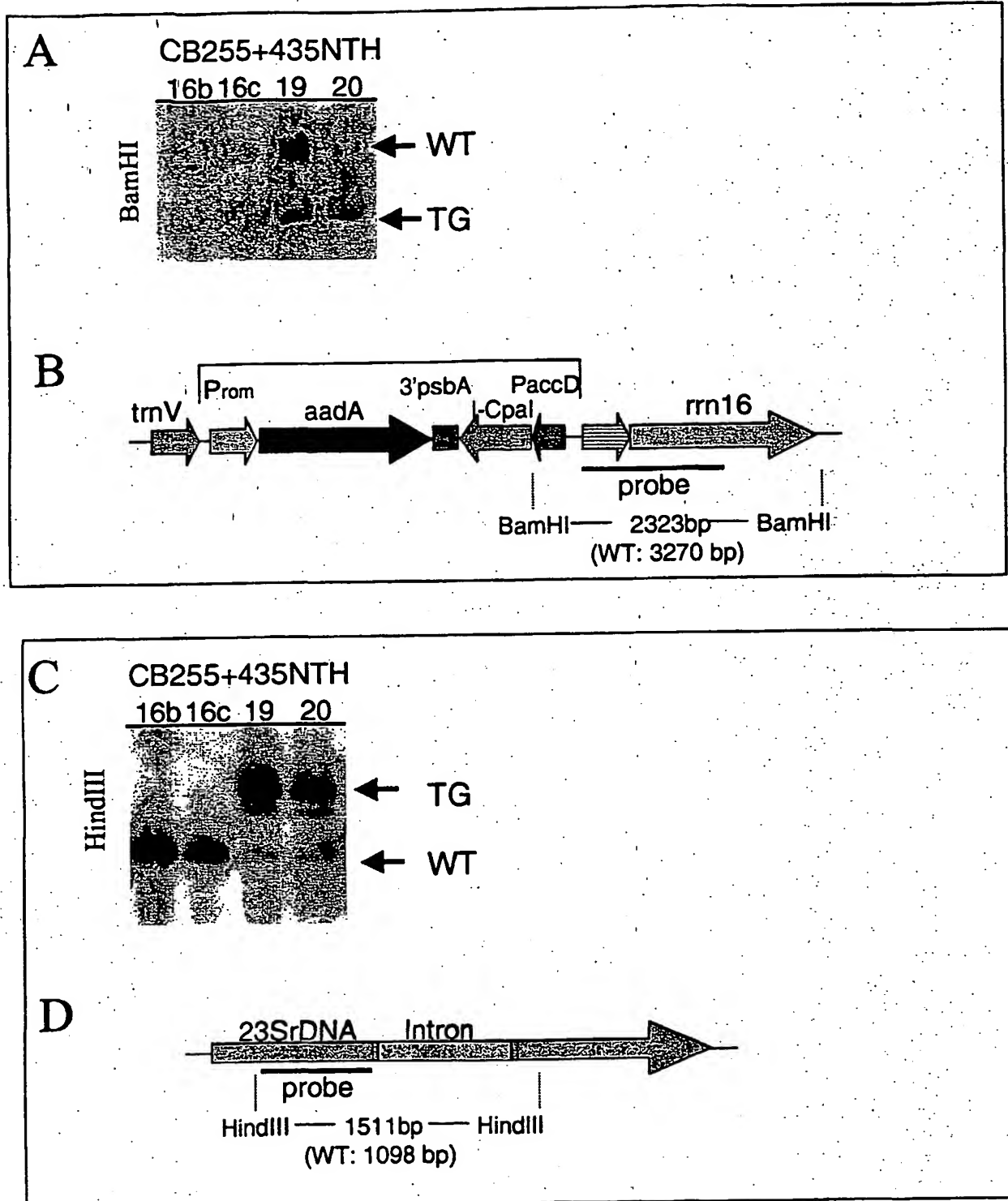
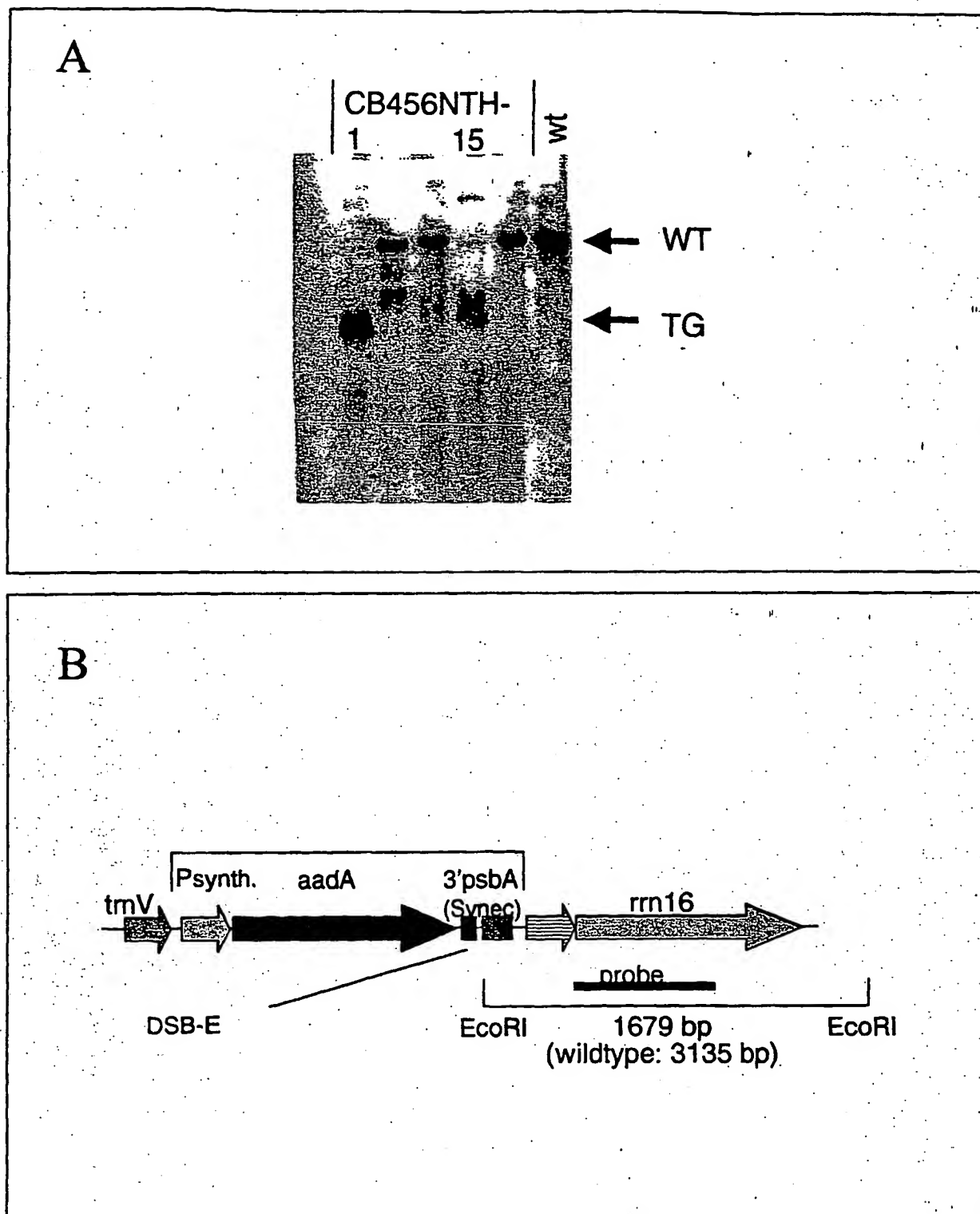


Fig. 11

**Fig. 12**

SEQUENZPROTOKOLL

<110> SunGene GmbH & Co.KGaA
 <120> Verfahren zur Transformation von pflanzlichen Plastiden
 <130> AE20010854 / PF 0081700028
 <140>
 <141>
 <160> 84
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 4363
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: plastid
 transformation plasmid pCB42-94
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (55)..(1405)
 <223> right targeting region
 <220>
 <221> mutation
 <222> (346)
 <223> mutation causing streptomycin resistance
 <220>
 <221> mutation
 <222> (68)
 <223> mutation causing spectinomycin resistance
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1404)..(1511)
 <223> multiple cloning site
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2629)..(3417)
 <223> Ampicilin resistance
 <400> 1
 ggcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttgccgc attcattaat gcagtgatga 60
 cttgacggca tctcacctt cctccggctt atcaccggca gtctgttcag gggtccaaac 120
 tcaacgatgg caactaaaca cgagggttgc gctcgttgcg ggacttaacc caacacctta 180
 cggcagcagc tgacgacagc catgcaccac ctgtgtccgc gttcccgaag gacccccctt 240
 ctttcaagag gattcgcggc atgtcaagcc ctggttaagg tcttcgcttt gcatcgaatt 300
 aaaccacatg ctccaccgct tgtgcggggc cccgtcaatt ccttttagtt tcattcttgc 360
 gaacgtactc cccaggcggg atacttaacg cgtagctac agcactgcac gggtcgatac 420
 gcacagcgcc tagtatccat cgtttacggc taggactact ggggtatcta atcccattcg 480
 ctcccctagc ttctgtctct cagtgtcagt gtcggcccag cagagtgtt tcgccgttgg 540
 tgttctttcc gatctctacg catttcaccg ctccaccgga aattccctct gccccctaccg 600
 tactccagct tggtagtttc caccgcctgt ccagggttga gccctgggat ttgacggcgg 660
 acttaaaaag ccacctacag acgctttacg cccaatcatt ccgataacg cttgcatcct 720
 ctgtattacc gcggctgctg gcacagagtt agccgatgct tattccccag ataccgtcat 780
 tgcttcttct cgggaaaag aagttcacga cccgtggggc ttctacctcc acgcggcatt 840
 gctccgtcag gctttcgccc attgcggaaa attccccact gctgcctccc gtaggagtct 900

gggccgtgtc	tcagtcccag	tgtggctgat	catectctcg	gaccagctac	tgatcatcgc	960
cttggttaagc	tattgcctca	ccaactagct	aatcagacgc	gagccccctcc	tcggggcgat	1020
tcctcctttt	gctcctcagc	ctacggggta	ttagcagccg	tttccagctg	ttgttcccct	1080
cccaagggca	ggttcttacg	cgttactcac	ccgtccgcca	ctggaaacac	cacttcccgt	1140
ccgacttgca	tgtgttaagc	atgccgccag	cgttcatcct	gagccaggat	cgaactctcc	1200
atgagattca	tagttgcatt	acttatagct	tccttgttcg	tagacaaagc	ggattcggaa	1260
ttgtctttca	ttccaaggca	taacttgat	ccatgcgctt	catattcgcc	cggagtctgc	1320
tcccagaaat	atagccatcc	ctgccccctc	acgtcaatcc	cacgagcctc	ttatccattc	1380
tcattgaacg	acggcggggg	agcgagctcc	accgcggtgg	cggccgctct	agaactagt	1440
gatcccccg	gctgcaggaa	ttcgatatca	agcttatcga	taccgtcgac	ctcgaggggg	1500
ggccccgtac	caaatccaac	tagaaaaact	cacattgggc	ttagggataa	tcaggctcga	1560
actgatgact	tccaccacgt	caaggtgaca	ctctaccgct	gagttatata	ccttccccgc	1620
cccatcgaga	aatagaactg	actaatccta	agtcaaagg	tcgagaaact	caacgccact	1680
attcttgaac	aacttggagc	cgggccttct	tttcgacta	ttacggatat	gaaaataatg	1740
gtcaaaatcg	gattcaattg	tcaactgccc	ctatcgaaa	taggattgac	taccgattcc	1800
gaaggaactg	gagttacatc	tcttttccat	tcaagagttc	ttatgcggtt	ccacgcccct	1860
ttgagacccc	gaaaaatgga	caaattcctt	ttcttaggaa	cacatacaag	attcgctact	1920
acaaaaagga	taatggtaac	cctaccatta	actacttcat	ttatgaattt	catagtaata	1980
gaaatacatg	tcctaccgag	acagaatttg	gaacttgcta	tcctcttgcc	tagcaggcaa	2040
agatttacct	ccgtggaaag	gatgattcat	tcggatcgac	atgagagtc	aactacattg	2100
ccagaatcca	tgttgtatat	ttgaaagagg	ttgacctct	tgcttctctc	atggtacact	2160
cctcttcccg	ccgagcccct	tttctcctcg	gtccacagag	acaaaatgta	ggactggtgc	2220
caacaattca	tcagactcac	taagtcggga	tcactaacta	ataactaatc	aatataatag	2280
tctaataat	ctaataat	agaaaatact	aatataatag	aaaagaactg	tcttttctgt	2340
atactttccc	cggttccgtt	gctaccgagg	gcctcgtgat	acgcctattt	ttataggtta	2400
atgtcatgat	aataatggtt	tcttagacgt	caggtggcac	ttttcgggga	aatgtgcgcg	2460
gaacccttat	ttgtttattt	ttctaaatac	attcaaatat	gtatccgctc	atgagacaat	2520
aaccctgata	aatgcttcaa	taatatggaa	aaaggaagag	tatgagtatt	caacatttcc	2580
gtgtcgccct	tattcccttt	tttgccgcat	tttgccctcc	tgtttttgct	caccagaaa	2640
cgctggtgaa	agtaaaagat	gctgaagatc	agttgggtgc	acgagtggtt	tacatcgaa	2700
tggatctcaa	cagcggttaag	atccttgaga	gttttcgccc	cgaagaacgt	tttccaatga	2760
tgagcaactt	tacagttctg	ctatgtggcg	gggtattatc	ccgtattgac	gccgggcaag	2820
agcaactcgg	tcgccgcata	cactattctc	agaatgactt	ggttgagtac	tcaccagtca	2880
cagaaaagca	tcttacggat	ggcatgacag	taagagaatt	atgcagtgtt	gccataacca	2940
tgagtataaa	cactgcggcc	aacttacttc	tgacaacgat	cggaggaccg	aaggagctaa	3000
ccgctttttt	gcacaacatg	ggggatcatg	taactcgctt	tgatcgttgg	gaaccggagc	3060
tgaatgaagc	cataccaaac	gacgagcgtg	acaccacgat	gcctgtagca	atggcaacaa	3120
cgttgcgcaa	actattaact	ggcgaaactac	ttactctagc	ttcccgcaa	caattaatag	3180
actggatgga	ggcgataaaa	gttgcaggac	cacttctgcg	ctcgccctt	ccggctggct	3240
ggtttattgc	tgataaatct	ggagccgggtg	agcgtgggtc	tcgcggtatc	attgcagcac	3300
tggggccaga	tggttaagccc	tcccgatcgc	tagttatcta	cacgacgggg	agtcaggcaa	3360
ctatggatga	acgaaataga	cagatcgctg	agataggtgc	ctcactgatt	aagcattggt	3420
aactgtcaga	ccaagtttac	tcatatatac	tttagattga	tttaaaactt	catttttaat	3480
ttaaaaggat	ctaggtgaag	atcctttttg	ataatctcat	gaccaaatac	ccttaacgtg	3540
agttttcgtt	ccactgagcg	tcagaccccc	tagaaaagat	caaaggatct	tcttgagatc	3600
ctttttttct	gcgcgtaatc	tgctgcttgc	aaacaaaaaa	accaccgcta	ccagcgggtg	3660
tttgtttgce	ggatcaagag	ctaccaactc	tttttccgaa	ggtaactggc	ttcagcagag	3720
cgcagatacc	aaatactgtc	cttctagtgt	agcgtagtgt	aggccaccac	ttcaagaact	3780
ctgtagcacc	gcctacatac	ctcgtctctg	taatcctgtt	accagtggct	gctgccagtg	3840
gcgataagtc	gtgtcttacc	gggttggaact	caagacgata	gttaccggat	aaggcgcagc	3900
ggtcgggctg	aacggggggg	tcgtgcacac	agcccagctt	ggagcgaacg	acctacaccg	3960
aactgagata	cctacagcgt	gagctatgag	aaagcggcac	gcttcccgaa	gggagaaagg	4020
cggacaggta	tccggtaagc	ggcagggtcg	gaacaggaga	gcgcacgagg	gagcttccag	4080
ggggaaacgc	ctggatatct	tatagtctctg	tcgggtttcg	ccacctctga	cttgagcgtc	4140
gatttttgtg	atgctcgtca	ggggggcgga	gcctatggaa	aaacgccagc	aacgcggcct	4200
ttttacgggt	cctggccttt	tgtctgcctt	ttgctcacat	gttctttcct	gcgttatccc	4260

ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataaccgt cgccgcagcc 4320
 gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgcgag aggaagcgga aga 4363

<210> 2

<211> 1359

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Insert of
 vector pCB199-3

<400> 2

gagctctgat cacggaagat agctttggca aaaaaagcaa aaagcattta ccttgattga 60
 gatgttaatt gtgttggcaa ttatcagtat ttaatttttg ctttttgtgc caaatttgat 120
 actagagctt cgggtgccag ggcgtgccct tgggctcccc gggcgcgtag tcgacgctac 180
 cttaaagagag tcaagcttct atattaccct gttatcccta gcgtactcga gaaaaaaga 240
 aaggagcaat agcaccctct tgatagaaca agaaaatgat tattgtcctt ttcttttcaa 300
 aacctcctat agactaggcc aggaattatc tgcagttatt tgccaactac cttagtgtac 360
 tcgcctttca cgtagtggac aaattcttcc aactgatctg cgcgcgaggc caagcgatct 420
 tcttcttgtc caagataagc ctgtctagct tcaagtatga cgggctgata ctgggcccgc 480
 aggcgtcca ttgcccagtc ggcagcgaca tccttcggcg cgattttgce ggttactgag 540
 ctgtaccaaa tgcgggacaa cgtaagcact acatttcgct catcgcbagc ccagtcgggc 600
 ggcgagttcc atagcgtaa ggtttcattt agcgccctcaa atagatcctg ttcaggaacc 660
 ggatcaaaga gttcctccgc cgctggacct accaaggcaa cgctatgttc tcttgctttt 720
 gtcagcaaga tagccagatc aatgtcgatc gtggctggct cgaagatacc tgcaagaatg 780
 tcattgcgct gccattctcc aaattgcagt tcgcgcttag ctggataacg ccacggaatg 840
 atgtcgtcgt gcacaacaat ggtgacttct acagcgcgga gaatctcgt ctctccaggg 900
 gaagccgaag tttccaaaag gtcgttgatc aaagctcgcc gcgttggttc atcaagcctt 960
 acggtcaccg taaccagcaa atcaatatca ctgtgtggct tcaggccgcc atccactgag 1020
 gagccgtaca aatgtacggc cagcaacgct ggttcgagat ggcgctcgat gacgccaact 1080
 acctctgata gttgagttga tacttcggcg ataaccgctt cagagccat ggctgtttgt 1140
 ggtgtcatgg ctgtttgtgg tgatcatgaat ccctccctac aactagatcc tcgcccggag 1200
 ttgctccca gaaatatagc catcctgccc ccctcacgct aatcccacga gcctcttacc 1260
 cattctcatt gaacgacggc gtcgaggggg ggcgggtac gtcgacgaag ttcctattcc 1320
 gaagttccta ttctcaagaa agtataggaa ctctgtacc 1359

<210> 3

<211> 1070

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: insert of
 vector pCB401-20

<400> 3

gagctctgat cacggaagat agctttggca aaaaaagcaa aaagcattta ccttgattga 60
 gatgttaatt gtgttggcaa ttatcagtat ttaatttttg ctttttgtgc caaatttgat 120
 actagagctt cgggtgccag ggcgtgccct tgggctcccc gggcgcgtag tcgacgctac 180
 cttaaagagag tcaagcttct atattaccct gttatcccta gcgtactcga gctgcagtta 240
 ttgccaact accttagtga tctgcgcttt cacgtagtgg acaaattctt ccaactgatc 300
 tgcgcgcgag gccaagcgat cttcttcttg tccaagataa gcctgtctag cttcaagtat 360
 gacgggctga tactgggccc gcaggcgctc cattgcccag tcggcagcga catccttcgg 420
 cgcgattttg ccggttactg cgctgtacca aatgcgggac aacgtaagca ctacatttcg 480
 ctcacgcga gccagtcgg gcggcgagtt ccatacggtt aaggtttcat ttacgcctc 540
 aaatagatcc tgttcaggaa ccggatcaaa gatttcctcc gccgctggac ctaccaaggc 600
 aacgctatgt tctcttgctt ttgtcagcaa gatagccaga tcaatgtcga tcgtggctgg 660
 ctgcaagata cctgcaagaa tgatcattgc ctgccattct ccaaattgca gttcgcgctt 720
 agctggataa cgccacggaa tgatgtcgtc gtgcacaaca atggtgactt ctacagcgcg 780
 gagaatctcg ctctctccag gggaagccga agtttccaaa aggtcgttga tcaagctcg 840

ccgcgttggt tcatcaagcc ttacgggtcac cgtaaccagc aaatcaatat cactgtgtgg 900
 cttcaggccg ccatccactg cggagccgta caaatgtacg gccagcaacg tcggttcgag 960
 atggcgctcg atgacgcaa ctacctctga tagttgagtt gatacttcgg cgataaccgc 1020
 ttcacgagcc atggttcct ccctacaacg tcgagggggg gcccggtacc 1070

<210> 4

<211> 804

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: insert of
 vector pCB289-13

<220>

<221> CDS

<222> (154)..(642)

<223> sequence coding for I-PpoI homing-endonuclease

<400> 4

ggtaccgggc cccccctcga cgccgtcggt caatgagaat ggataagagg ctcgtgggat 60
 tgacgtgagg gggcagggat ggctatattt ctgggagcga actccgggag aggatctagt 120
 tgtagggagg gattcatgac accacaaaca gcc atg gcg ctc acc aat gct caa 174
 Met Ala Leu Thr Asn Ala Gln

1

5

atc ttg gct gtg att gac agt tgg gaa gaa aca gtc ggt cag ttt cca 222
 Ile Leu Ala Val Ile Asp Ser Trp Glu Glu Thr Val Gly Gln Phe Pro
 10 15 20

gtg ata acg cac cat gta cca tta ggt ggc ggt ctg caa gga acg ctc 270
 Val Ile Thr His His Val Pro Leu Gly Gly Gly Leu Gln Gly Thr Leu
 25 30 35

cat tgt tac gag atc ccc cta gca gct cct tat ggg gtt ggc ttt gct 318
 His Cys Tyr Glu Ile Pro Leu Ala Ala Pro Tyr Gly Val Gly Phe Ala
 40 45 50 55

aag aat ggg cct acc cgc tgg caa tac aaa cgg aca atc aat caa gtc 366
 Lys Asn Gly Pro Thr Arg Trp Gln Tyr Lys Arg Thr Ile Asn Gln Val
 60 65 70

gtc cac aga tgg ggg tcc cac aca gtc cct ttt cta tta gaa ccg gat 414
 Val His Arg Trp Gly Ser His Thr Val Pro Phe Leu Leu Glu Pro Asp
 75 80 85

aac atc aac ggc aaa acc tgc aca gca tcg cac cta tgt cat aat act 462
 Asn Ile Asn Gly Lys Thr Cys Thr Ala Ser His Leu Cys His Asn Thr
 90 95 100

cga tgc cac aat ccc ttg cac ttg tgc tgg gag tca cta gac gac aac 510
 Arg Cys His Asn Pro Leu His Leu Cys Trp Glu Ser Leu Asp Asp Asn
 105 110 115

aaa ggc aga aac tgg tgc ccc ggt ccc aac ggg gga tgt gtc cat gcg 558
 Lys Gly Arg Asn Trp Cys Pro Gly Pro Asn Gly Gly Cys Val His Ala
 120 125 130 135

gtg gtt tgt tta agg cag ggt ccg ttg tac ggc cca ggg gcg act gtg 606
 Val Val Cys Leu Arg Gln Gly Pro Leu Tyr Gly Pro Gly Ala Thr Val
 140 145 150

gca ggt cct caa caa agg ggc agt cac ttt gtg gta taactgcaga 652
 Ala Gly Pro Gln Gln Arg Gly Ser His Phe Val Val
 155 160

agcttcaatt gcatgctcta gatgatcaaa gaattcctgg cctagtctat aggaggtttt 712
 gaaaagaaag gagcaataat cattttcttg ttctatcaag aggggtgctat tgctcctttc 772
 tttttttctc gagaggggta cgtaccgagc tc 804

<210> 5

<211> 163

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: insert of
 vector pCB289-13

<400> 5

Met	Ala	Leu	Thr	Asn	Ala	Gln	Ile	Leu	Ala	Val	Ile	Asp	Ser	Trp	Glu
1				5					10					15	
Glu	Thr	Val	Gly	Gln	Phe	Pro	Val	Ile	Thr	His	His	Val	Pro	Leu	Gly
		20						25					30		
Gly	Gly	Leu	Gln	Gly	Thr	Leu	His	Cys	Tyr	Glu	Ile	Pro	Leu	Ala	Ala
		35					40					45			
Pro	Tyr	Gly	Val	Gly	Phe	Ala	Lys	Asn	Gly	Pro	Thr	Arg	Trp	Gln	Tyr
	50					55					60				
Lys	Arg	Thr	Ile	Asn	Gln	Val	Val	His	Arg	Trp	Gly	Ser	His	Thr	Val
	65				70					75				80	
Pro	Phe	Leu	Leu	Glu	Pro	Asp	Asn	Ile	Asn	Gly	Lys	Thr	Cys	Thr	Ala
				85					90					95	
Ser	His	Leu	Cys	His	Asn	Thr	Arg	Cys	His	Asn	Pro	Leu	His	Leu	Cys
		100						105					110		
Trp	Glu	Ser	Leu	Asp	Asp	Asn	Lys	Gly	Arg	Asn	Trp	Cys	Pro	Gly	Pro
		115					120					125			
Asn	Gly	Gly	Cys	Val	His	Ala	Val	Val	Cys	Leu	Arg	Gln	Gly	Pro	Leu
	130					135					140				
Tyr	Gly	Pro	Gly	Ala	Thr	Val	Ala	Gly	Pro	Gln	Gln	Arg	Gly	Ser	His
	145				150					155				160	
Phe	Val	Val													

<210> 6

<211> 1150

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

XhoI / Bgl II fragment for construction of
 vector pCB304-25

<400> 6

ctcgagtatt	cggctcaatc	cttttagtaa	aagattgggc	cgagtttaat	tgcaattcaa	60
tttaagagaac	gaaggataat	tacttgagtt	ctttctcctt	atccttcttt	atttctgtct	120
aatttatctg	ctaattgtcta	ctgaattcaa	gcttggatcc	gcggccgcct	agcttgggtc	180
ccgctcagaa	gaactcgtca	agaaggcgat	agaaggcgat	gcgctgcgaa	tcgggagcgg	240
cgataccgta	aagcacgagg	aagcggtcag	cccattcgcc	gccaagctct	tcagcaatat	300
cacgggtagc	caacgctatg	tcttgatagc	ggtccggcac	accagccgg	ccacagtcga	360
tgaatccaga	aaagcggcca	ttttccacca	tgatattcgg	caagcaggca	tcgccatggg	420

```

tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc ggccttgag cctggcgaac agttcggctg 480
gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat cctctgac gacaagaccg gcttccatcc 540
gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttgggtggtc gaatgggcag gtagccggat 600
caagcgatag cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg gcaggagcaa 660
ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag tcccttcccg 720
cttcagtgc aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc cgctcgtggcc agccacgata 780
gccgcgctgc ctgctcctgc agttcattca gggcaccgga caggctcggtc ttgacaaaaa 840
gaaccgggag cccctgcgct gacagccgga acacggcgcc atcagagcag ccgattgtct 900
gtttgtgccc gtcatacgcc aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa cctgcgtgca 960
atccatcttg ttcaatccaa gctcccatgg ctgtttgtgg tgtcatgaat cctccctac 1020
aactagatcc tatatactat agagataggt ggataaatat ttttctttag taagacccca 1080
tcgctaatat taatttatct aacatattaa ttaatattta atatataaat atatatagag 1140
tcgagatcta                                     1150

```

<210> 7

<211> 454

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: insert of
vector pCB220-17

<400> 7

```

gaagacgacg ctaaatagca atatttacct ttgggaccaa aagttatcag gcacgcacct 60
ggtagctagt ctttaaacca atagattgca tcggtttaaa aggcaagacc gtcaaattgc 120
gggaaagggg tcaacagccg ttcagtacca agtctcagg gaaactttga gatggccttg 180
caaaggggat ggtaataagc tgacggacat ggtcctaacc acgcagccaa gtccctaagtc 240
aacagatctt ctgttgatat ggatgcagtt cacagactaa atgtcggctc gggaagatgt 300
attcttctca taagatatag tcggacacct ccttaatggg agctagcgga tgaagtgatg 360
caacactgga gccgctggga actaatttgc atgcgaaagt atattgatta gttttggagt 420
actcgaaggt agcgaaattc cttgtcaagt cttc                                     454

```

<210> 8

<211> 498

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: insert of
vector pCB270-1

<400> 8

```

gcgcgcgtaa tacgactcac tatagggcga attgggggag actgtttacc aaaaacacag 60
gtctccgcaa agtcgtaaga ccatgtatgg gggctgacgc ctgcccagtg ccggaaggctc 120
aaggaagttg gtgacctgat gacaggggag ccggcgaccg aagccccggt gaacggcggc 180
cgtaactata acggtcctaa gtcttcgaat cgaattcact agtgatagga agacctgtgc 240
gggtaagttc cgaccgcac gaaaggcgta acgatctggg cactgtctcg gagagaggct 300
cgggtgaaata gacatgtctg tgaagatgcg gactacctgc acctggacag agagacccca 360
attcctggcc tagtctatag gaggttttga aaagaaagga gcaataatca ttttcttgtt 420
ctatcaagag ggtgctattg ctcccttctt ttttctcga ccagcttttg ttccctttag 480
tgagggttaa ttgcgcgc                                     498

```

<210> 9

<211> 789

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: lacZ gene
with inserted intron to demonstrate spleissing
(from vector pCB315-1)

<400> 9

```

acaatttcca ttcgccattc aggctgcgca actgttggga agggcgatcg gtgcggggcct 60
cttcgctatt acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa 120
cgccagggtt tcccagtcga cgacgttgta aaacgacggc cagtgagcgc gcgtaatacg 180
actcactata gggcgcaattg ggtaccgggc cccccctcga ggtcgacggg atcgataagc 240
ttgacccgac aaggaatttc gctaccttcg agtactccaa aactaatcaa tatactttcg 300
catacaaatt agttcccagc ggctccagtg ttgcatcact tcatccgcta gctccatta 360
aggagaggtc cgactatata ttatgagaag aatacatctt ccccgaccga catttagtct 420
gtgaactgca tccatatcaa cagaagatct gttgacttag gacttggctg cgtgggttagg 480
accatgtccg tcagcttatt accataccct ttgcaaggcc atctcaaagt tccccctgag 540
acttgggtact gaacggctgt tgaccccttt cccgcaattt gacggtcttg ccttttaaac 600
cgatgcaate tattggttta aagactagct accaggtgca tgcttgataa cttttgggtcc 660
caaaggtaaa tattgctatt taggaccgtt aggatccact agttctagag cggccgccac 720
cgcggtggag ctccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aattgcgcgc ttggcgtaat 780
catggtcat 789

```

<210> 10

<211> 2566

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Ll.LtrB
intron from vector pCB345-34.

<400> 10

```

gaattcgccc tttgaagact tgacatttga tatggtgaag tagggaggta ccgccttggt 60
cacattactg tgactgggtt gcaccaccct cttcggggaa cgtacgtacc cctctcggag 120
tatacggtc tgttattggt cgttcgtaaa aattcacttg tgtttatgaa tcacgtgacg 180
atgacaatga aagcatacaa caagagtttt acgttggttc gctatcattg ccatctccca 240
tttttctttg cttttaagat ttttgacctt attgacatgg tgaatttcat aggaagtatt 300
ttcatcagat gttccacata attcacaaca tttagctttt aaactgtttt caagagtatt 360
ccgggcatag ccatacaata caggagcttg acttatctta tccgtaaatt gataagggga 420
tttacattca ctaaaatttg caaaataacg gcgctgctta ctttgcttta tctcatcagg 480
gatgccccac gaaccacttc catctttaaa catggaaatg gtttttgaaa gtgttccctt 540
atggttggag gctatcggtt ttagacagct gtattccata agataagcaa aataattgag 600
ctggttaaaa ttacttgcta gaccgtagta attacaaatc cctcttaatt cagaattata 660
aattgtgatg atttctaagt ctgttgaacg aataagatat ttctgtgtaa ctggaaacca 720
tgagctatct ttcttttggg tagctatttt cttgtcaaaa ataaattgac gaattttgtc 780
ttgaagagga ataaggagtt ctacactccc attgagtgtt ctctttttga ctttaccaga 840
tcgttttatc gttccacttc tccttactcg tatatcatat cccagaaaac gagcgggttg 900
actgctatgt gtgatgagtg tttttcttcc actcaattcc atttttagct tgttatgaat 960
aaaaagtfff aattgttctt ttatccattg acagtcctct ttgcttccct taacagagat 1020
aatgaagtcg tccgcatacc ggacgtattt caatacttta tttgtctgtg aggtacaggg 1080
gagtgtgggt aatcttttac gtttttcttg atattctaaa agaacttttag ctttttcttc 1140
accctccaac ttcttgagac ggtgagaaat tctttttatc tcattgtgaa gttcccgata 1200
ttcagggtgtt attctttctg gactttctcg gtcaaacttc attttgagtt gtaaaacaaa 1260
cttatccaat tcatgaagat agatgttggc caaaagagga gatagaattc caccttgagg 1320
tggtccgctg taagttttgt gatactgcca gttttccaga taacctgctt ttgaaattt 1380
ataaatcaat tgggtcattt tcatatcttt gattttaaga ttgatgagtc caatgagtg 1440
aacgtggtct atattatcga agcagccttt tatatctccc tcacaaaacc atcttgccgc 1500
gccaactctt cttttgattg ttttcaaagc cgtgtgacag cttcgttgag gtctaaaacc 1560
gtgagacaca tcttcgaata ccggttcata gatagattca agaattatc tcacagcttc 1620
ttgatcaat ttatctgtga aagttggaat tcctaaaggt ctcatctttt tagaattctt 1680
ttttgcaata tacattcttc gtacagggtg aggatagtaa gttccgtctt ttaaagattg 1740
aataatcttt tttatttttt cttcactaaa gccatccgct gtatcatcta atattcttt 1800
tgtggaagct cttttattgg aatataaatt ttgatacgcc acgtaataaa tatctggacg 1860
taaaagataa cgataaagtc ttgtaaaaac ttcgtctata ttttcttggt aatttttact 1920
gattctttct aaaattgcc a ttgttggttt cattttgagg ttttctccc taatcaattt 1980

```

```

ttaatttttag tacacaataa ctgtaccctt ttgccatgta aagggcggtta cccttctcag 2040
actactacga gtactccgta cccttgcaag attttcaagc tctagtgcta tagccttttt 2100
cctcctttct attaggcatt cttgtttagg gtatccccag ttagtggtta gtcttggtta 2160
attcagattc tcggcatcgc tttcgtttcg ttcccatagg ttctcctaca gattgtacaa 2220
atgtggatgat aacagataag tccacaacca taacttacct ttctttgtac tagagggttc 2280
agacactttc ctctatcgac acataaccga aattagaaac ttgckttcag taaacacaac 2340
ttatacctta tatctgatta acattgacgac tcagtcgtac ccgattgtct ttaggttaact 2400
catcgctttc caaccgtgct ctgttcccgt atcagctttc gcttttcggt taggttggct 2460
gttttctgtg ttatcttaca gagtagtacc ttaaactact tgacttaaca ccctatctgg 2520
gcgcacgtta tggatgtgtt aggaatgtct tctcaagggc gaattc 2566

```

<210> 11

<211> 520

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetic
sequence coding for I-Ppo I homing-endonuclease.

<220>

<221> CDS

<222> (16)..(504)

<400> 11

```

gcataatgaga tctcc atg gcg ctc acc aat gct caa atc ttg gct gtg att 51
Met Ala Leu Thr Asn Ala Gln Ile Leu Ala Val Ile
      1              5              10

```

```

gac agt tgg gaa gaa aca gtc ggt cag ttt cca gtg ata acg cac cat 99
Asp Ser Trp Glu Glu Thr Val Gly Gln Phe Pro Val Ile Thr His His
      15              20              25

```

```

gta cca tta ggt ggc ggt ctg caa gga acg ctc cat tgt tac gag atc 147
Val Pro Leu Gly Gly Gly Leu Gln Gly Thr Leu His Cys Tyr Glu Ile
      30              35              40

```

```

ccc cta gca gct cct tat ggg gtt ggc ttt gct aag aat ggg cct acc 195
Pro Leu Ala Ala Pro Tyr Gly Val Gly Phe Ala Lys Asn Gly Pro Thr
      45              50              55              60

```

```

cgc tgg caa tac aaa cgg aca atc aat caa gtc gtc cac aga tgg ggg 243
Arg Trp Gln Tyr Lys Arg Thr Ile Asn Gln Val Val His Arg Trp Gly
      65              70              75

```

```

tcc cac aca gtc cct ttt cta tta gaa ccg gat aac atc aac ggc aaa 291
Ser His Thr Val Pro Phe Leu Leu Glu Pro Asp Asn Ile Asn Gly Lys
      80              85              90

```

```

acc tgc aca gca tcg cac cta tgt cat aat act cga tgc cac aat ccc 339
Thr Cys Thr Ala Ser His Leu Cys His Asn Thr Arg Cys His Asn Pro
      95              100              105

```

```

ttg cac ttg tgc tgg gag tca cta gac gac aac aaa ggc aga aac tgg 387
Leu His Leu Cys Trp Glu Ser Leu Asp Asp Asn Lys Gly Arg Asn Trp
      110              115              120

```

```

tgc ccc ggt ccc aac ggg gga tgt gtc cat gcg gtg gtt tgt tta agg 435
Cys Pro Gly Pro Asn Gly Gly Cys Val His Ala Val Val Cys Leu Arg
      125              130              135              140

```

```

cag ggt ccg ttg tac ggc cca ggg gcg act gtg gca ggt cct caa caa 483
Gln Gly Pro Leu Tyr Gly Pro Gly Ala Thr Val Ala Gly Pro Gln Gln
      145              150              155

```

agg ggc agt cac ttt gtg gta taactgcagc tcgagg
 Arg Gly Ser His Phe Val Val
 160

520

<210> 12

<211> 163

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetic
 sequence coding for I-Ppo I homing-endonuclease

<400> 12

Met Ala Leu Thr Asn Ala Gln Ile Leu Ala Val Ile Asp Ser Trp Glu
 1 5 10 15
 Glu Thr Val Gly Gln Phe Pro Val Ile Thr His His Val Pro Leu Gly
 20 25 30
 Gly Gly Leu Gln Gly Thr Leu His Cys Tyr Glu Ile Pro Leu Ala Ala
 35 40 45
 Pro Tyr Gly Val Gly Phe Ala Lys Asn Gly Pro Thr Arg Trp Gln Tyr
 50 55 60
 Lys Arg Thr Ile Asn Gln Val Val His Arg Trp Gly Ser His Thr Val
 65 70 75 80
 Pro Phe Leu Leu Glu Pro Asp Asn Ile Asn Gly Lys Thr Cys Thr Ala
 85 90 95
 Ser His Leu Cys His Asn Thr Arg Cys His Asn Pro Leu His Leu Cys
 100 105 110
 Trp Glu Ser Leu Asp Asp Asn Lys Gly Arg Asn Trp Cys Pro Gly Pro
 115 120 125
 Asn Gly Gly Cys Val His Ala Val Val Cys Leu Arg Gln Gly Pro Leu
 130 135 140
 Tyr Gly Pro Gly Ala Thr Val Ala Gly Pro Gln Gln Arg Gly Ser His
 145 150 155 160
 Phe Val Val

<210> 13

<211> 481

<212> DNA

<213> Chlamydomonas pallidostigmatica

<220>

<221> CDS

<222> (4)..(459)

<223> ORF coding for I-Cpa I homing endonuclease

<400> 13

acc atg gac att aat cct caa tgg att aca ggt ttc gta gat ggg gaa 48
 Met Asp Ile Asn Pro Gln Trp Ile Thr Gly Phe Val Asp Gly Glu
 1 5 10 15
 ggt tgt ttt agt gta agt ata ctt aga aat aat tgc ttg cgc tat ggc 96
 Gly Cys Phe Ser Val Ser Ile Leu Arg Asn Asn Ser Leu Arg Tyr Gly
 20 25 30
 cat cag ctt caa cca gaa ttc gta gtg acc caa cat aaa tta gat gca 144
 His Gln Leu Gln Pro Glu Phe Val Val Thr Gln His Lys Leu Asp Ala
 35 40 45

```

aat gtt tta tat gca tta aaa gac tac ttt aaa gtt gga tca gtc gtt 192
Asn Val Leu Tyr Ala Leu Lys Asp Tyr Phe Lys Val Gly Ser Val Val
      50                      55                      60

gtg aat cat ggg gaa cgg ctt tgc tat aaa gtc aaa aat att gat cac 240
Val Asn His Gly Glu Arg Leu Cys Tyr Lys Val Lys Asn Ile Asp His
      65                      70                      75

ttt ata acc gtc att ata cca ttt ttc gaa aaa cat gag cta aaa aca 288
Phe Ile Thr Val Ile Ile Pro Phe Phe Glu Lys His Glu Leu Lys Thr
      80                      85                      90                      95

aaa aga aga att gaa ttt ctt cga ttt cga aaa atc tgc ttg ctg tta 336
Lys Arg Arg Ile Glu Phe Leu Arg Phe Arg Lys Ile Cys Leu Leu Leu
      100                      105                      110

aaa gca ggt aga cat tta gaa tcg cag gaa gga ttc gag aaa gtg ttg 384
Lys Ala Gly Arg His Leu Glu Ser Gln Glu Gly Phe Glu Lys Val Leu
      115                      120                      125

gat tta gca aaa aaa ctc cgt atc aat gag aaa aac tac cag gaa tct 432
Asp Leu Ala Lys Lys Leu Arg Ile Asn Glu Lys Asn Tyr Gln Glu Ser
      130                      135                      140

atc aaa cgt ttt gaa gaa act ggc gag taactcgaga gtatagagct cc 481
Ile Lys Arg Phe Glu Glu Thr Gly Glu
      145                      150

```

<210> 14

<211> 152

<212> PRT

<213> Chlamydomonas pallidostigmatica

<400> 14

```

Met Asp Ile Asn Pro Gln Trp Ile Thr Gly Phe Val Asp Gly Glu Gly
 1      5      10      15

Cys Phe Ser Val Ser Ile Leu Arg Asn Asn Ser Leu Arg Tyr Gly His
      20      25      30

Gln Leu Gln Pro Glu Phe Val Val Thr Gln His Lys Leu Asp Ala Asn
      35      40      45

Val Leu Tyr Ala Leu Lys Asp Tyr Phe Lys Val Gly Ser Val Val Val
      50      55      60

Asn His Gly Glu Arg Leu Cys Tyr Lys Val Lys Asn Ile Asp His Phe
      65      70      75      80

Ile Thr Val Ile Ile Pro Phe Phe Glu Lys His Glu Leu Lys Thr Lys
      85      90      95

Arg Arg Ile Glu Phe Leu Arg Phe Arg Lys Ile Cys Leu Leu Leu Lys
      100      105      110

Ala Gly Arg His Leu Glu Ser Gln Glu Gly Phe Glu Lys Val Leu Asp
      115      120      125

Leu Ala Lys Lys Leu Arg Ile Asn Glu Lys Asn Tyr Gln Glu Ser Ile
      130      135      140

Lys Arg Phe Glu Glu Thr Gly Glu
      145      150

```

<210> 15

<211> 917

<212> DNA

<213> Chlamydomonas pallidostigmatica

<220>

<221> intron

<222> (18)..(893)

<223> CPLSU2 Intron

<400> 15

```

gaagacgatc ctaagggttaa ttgctagctt tagtaaaact gaactatatg ctggaaaatc 60
ctcgggcctc ttctttcccc agttgcactt cgtgctaaag cgggcagatg aaactataaa 120
gcaaaaagag gctcatcact tttttttacc ggaactccgt tccggcttaa agtgatgaaa 180
aagatgtctt gtacgtctcg tattttgccg cgagccgtga taatcaagcg tacatgggga 240
caatcagcag ggaaggatgt ttgatacagc cagagtagaa ctggcagtcct agaatcgggc 300
ggtatcgcta aacataaccc tcagagacta tacgttcgga agtcttaata atcataataa 360
taggaggaaa ttgaaaatgg acattaatcc tcaatggatt acaggtttcg tagatgggga 420
aggttgtttt agtgtaagta tacttagaaa taattcggtg cgctatggcc atcagcttca 480
accagaattc gtagtgaccc aacataaatt agatgcaaat gttttatatg cattaaaaga 540
ctactttaaa gttggatcag tcgttgtgaa tcatggggaa cggctttgct ataaagtcaa 600
aaatattgat cactttataa ccgtcattat accatttttc gaaaacatg agctaaaaac 660
aaaaagaaga attgaatttc ttcgatttcg aaaaatctgc ttgctgttaa aagcaggtag 720
acatttagaa tcgcaggaag gattcgagaa agtgttggat ttagcaaaaa aactccgtat 780
caatgagaaa aactaccagg aatctatcaa acgttttgaa gaaactggcg agtaaaaaaa 840
ataagattta agatagagtc cagcctattt tgaagaaaaa tggggtaaat ctgagcgaaa 900
ttccttgatc agtcttc 917

```

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 16

taaggccctc ggtagcaacg g

21

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 17

ggggtaccaa atccaactag

20

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 18

ggagctcgct ccccgccgt cgttc

25

<210> 19

<211> 27

<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer
<400> 19
gatgcatgat gacttgacgg catcctc
<210> 20
<211> 16
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer
<400> 20
gtcgacagat ctttaa
<210> 21
<211> 16
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer
<400> 21
agatctgtcg acttaa
<210> 22
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer
<400> 22
gatctccagt taactggggt ac
<210> 23
<211> 14
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer
<400> 23
cccagttaac tgga
<210> 24
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

27

16

16

22

14

<400> 24
ttaagccagt taactgggcg gagct 25
<210> 25
<211> 17
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer
<400> 25
ccgcccagtt aactggc 17
<210> 26
<211> 34
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer
<400> 26
tcgagaagat cagcctgtta tccctagagt aact 34
<210> 27
<211> 34
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer
<400> 27
ctagagttac tctagggata acaggctgat cttc 34
<210> 28
<211> 17
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer
<400> 28
agaagacgat cctaagg 17
<210> 29
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer
<400> 29
tgaagacttg acaaggaatt tcg 23
<210> 30
<211> 56
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer
 <400> 30
 agaagacgat cctaaatagc aatattttacc tttgggacca aaagttatca ggcattg 56
 <210> 31
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer
 <400> 31
 tgaagacttg acaaggaatt tcgctacctt cgagtactcc aaaactaatc 50
 <210> 32
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer
 <400> 32
 gagaagacat tcctaacaca tccataacgt gcg 33
 <210> 33
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer
 <400> 33
 tgaagacttg acatttgata tggatgaagta gg 32
 <210> 34
 <211> 175
 <212> DNA
 <213> Pisum sativum
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(174)
 <223> plastid translocalization sequence
 <400> 34
 atg gct tct atg ata tcc tct tca gct gtg act aca gtc agc cgt gct 48
 Met Ala Ser Met Ile Ser Ser Ser Ala Val Thr Thr Val Ser Arg Ala
 1 5 10 15
 tct acg gtg caa tcg gcc gcg gtg gct cca ttc ggc ggc ctc aaa tcc 96
 Ser Thr Val Gln Ser Ala Ala Val Ala Pro Phe Gly Gly Leu Lys Ser
 20 25 30
 atg act gga ttc cca gtt aag aag gtc aac act gac att act tcc att 144
 Met Thr Gly Phe Pro Val Lys Lys Val Asn Thr Asp Ile Thr Ser Ile
 35 40 45
 aca agc aat ggt gga aga gta aag tgc atg c 175
 Thr Ser Asn Gly Gly Arg Val Lys Cys Met
 50 55

<210> 35
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Pisum sativum
 <400> 35
 Met Ala Ser Met Ile Ser Ser Ser Ala Val Thr Thr Val Ser Arg Ala
 1 5 10 15
 Ser Thr Val Gln Ser Ala Ala Val Ala Pro Phe Gly Gly Leu Lys Ser
 20 25 30
 Met Thr Gly Phe Pro Val Lys Lys Val Asn Thr Asp Ile Thr Ser Ile
 35 40 45
 Thr Ser Asn Gly Gly Arg Val Lys Cys Met
 50 55

<210> 36
 <211> 84
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum
 <220>
 <221> TRANSIT
 <222> (1)..(84)
 <223> plastidic translocalisation signal derived from
 plastidic transketolase

<400> 36
 Met Ala Ser Ser Ser Ser Leu Thr Leu Ser Gln Ala Ile Leu Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Val Pro Arg His Gly Ser Ala Ser Ser Ser Gln Leu Ser Pro Ser
 20 25 30
 Ser Leu Thr Phe Ser Gly Leu Lys Ser Asn Pro Asn Ile Thr Thr Ser
 35 40 45
 Arg Arg Arg Thr Pro Ser Ser Ala Ala Ala Ala Val Val Arg Ser
 50 55 60
 Pro Ala Ile Arg Ala Ser Ala Ala Thr Glu Thr Ile Glu Lys Thr Glu
 65 70 75 80
 Thr Ala Gly Ser

<210> 37
 <211> 258
 <212> DNA
 <213> Nicotiana tabacum
 <220>
 <221> transit_peptide
 <222> (1)..(258)
 <223> plastidic translocalisation signal derived from
 plastidic transketolase (frame 1)

<400> 37
 ggtaccatgg cgtcttcttc ttctctcaact ctctctcaag ctatctctc tcgttctgtc 60
 cctcgccatg gctctgctc ttcttctcaa ctttccctt cttctctcac tttttccggc 120
 cttaaatcca atcccaatat caccacctcc cgccgccgta ctcttctc cgccgcccgc 180
 gccgcgctcg taaggtcacc ggcgattcgt gcctcagctg caaccgaaac catagagaaa 240
 actgagactg cgggatcc 258

<210> 38
 <211> 260
 <212> DNA
 <213> *Nicotiana tabacum*
 <220>
 <221> transit_peptide
 <222> (1)..(260)
 <223> plastidic translocalisation signal derived from
 plastidic transketolase (frame 2)
 <400> 38
 ggtaccatgg cgtcttcttc ttctctcaact ctctctcaag ctatcctctc tcgttctgtc 60
 cctcgccatg gctctgcctc ttcttctcaa ctttcccctt cttctctcac tttttccggc 120
 cttaaatacca atcccaatat caccacctcc cgccgccgta ctcttctc cgcgcgcc 180
 gccgccgtcg taaggtcacc ggcgattcgt gcctcagctg caaccgaaac catagagaaa 240
 actgagactg cgctggatcc 260
 <210> 39
 <211> 259
 <212> DNA
 <213> *Nicotiana tabacum*
 <220>
 <221> transit_peptide
 <222> (1)..(259)
 <223> plastidic translocalisation signal derived from
 plastidic transketolase (frame 3)
 <400> 39
 ggtaccatgg cgtcttcttc ttctctcaact ctctctcaag ctatcctctc tcgttctgtc 60
 cctcgccatg gctctgcctc ttcttctcaa ctttcccctt cttctctcac tttttccggc 120
 cttaaatacca atcccaatat caccacctcc cgccgccgta ctcttctc cgcgcgcc 180
 gccgccgtcg taaggtcacc ggcgattcgt gcctcagctg caaccgaaac catagagaaa 240
 actgagactg cggggatcc 259
 <210> 40
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*
 <220>
 <221> TRANSIT
 <222> (1)..(63)
 <223> plastidic translocalisation signal derived from
 plastidic isopentenylpyrophosphate isomerase-2
 (IPP-2)
 <400> 40
 Met Ser Ala Ser Ser Leu Phe Asn Leu Pro Leu Ile Arg Leu Arg Ser
 1 5 10 15
 Leu Ala Leu Ser Ser Ser Phe Ser Ser Phe Arg Phe Ala His Arg Pro
 20 25 30
 Leu Ser Ser Ile Ser Pro Arg Lys Leu Pro Asn Phe Arg Ala Phe Ser
 35 40 45
 Gly Thr Ala Met Thr Asp Thr Lys Asp Gly Ser Arg Val Asp Met
 50 55 60
 <210> 41
 <211> 205
 <212> DNA
 <213> *Arabidopsis thaliana*

```

<220>
<221> transit_peptide
<222> (1)..(205)
<223> plastidic translocalisation signal derived from
        plastidic isopentenylpyrophosphate isomerase-2
        (IPP-2) (frame 1)

<400> 41
gatatccaca ccaacaccaa tgtctgcttc ttctttatTT aatctcccat tgattcgctt 60
cagatctctc gctctttcgt cttctttttc ttctttccga tttgcccac gtcctctgtc 120
atcgatttca ccgagaaagt taccgaattt tcgtgctttc tctggtaccg ctatgacaga 180
tactaaagat ggatcccggg tcgac 205

<210> 42
<211> 207
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> transit_peptide
<222> (1)..(207)
<223> plastidic translocalisation signal derived from
        plastidic isopentenylpyrophosphate isomerase-2
        (IPP-2) (frame 2)

<400> 42
gatatccaca ccaacaccaa tgtctgcttc ttctttatTT aatctcccat tgattcgctt 60
cagatctctc gctctttcgt cttctttttc ttctttccga tttgcccac gtcctctgtc 120
atcgatttca ccgagaaagt taccgaattt tcgtgctttc tctggtaccg ctatgacaga 180
tactaaagat ctggatcccg gtcgac 207

<210> 43
<211> 206
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> transit_peptide
<222> (1)..(206)
<223> plastidic translocalisation signal derived from
        plastidic isopentenylpyrophosphate isomerase-2
        (IPP-2) (frame 3)

<400> 43
gatatccaca ccaacaccaa tgtctgcttc ttctttatTT aatctcccat tgattcgctt 60
cagatctctc gctctttcgt cttctttttc ttctttccga tttgcccac gtcctctgtc 120
atcgatttca ccgagaaagt taccgaattt tcgtgctttc tctggtaccg ctatgacaga 180
tactaaagat gggatcccgg gtcgac 206

<210> 44
<211> 44
<212> DNA
<213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(44)
<223> plastidic promoter PrbcL

<400> 44
gttgcgctat atatatgaaa gagtatacaa taatgatgta ttTg 44

<210> 45
<211> 64

```

<212> DNA
<213> Nicotiana tabacum
<220>
<221> promoter
<222> (1)..(64)
<223> plastidic promoter Prps16-107
<400> 45
tagcgatggg gtcttactaa agaaaaatat ttatccacct atctctatag tatatagata 60
taga 64
<210> 46
<211> 91
<212> DNA
<213> Nicotiana tabacum
<220>
<221> promoter
<222> (1)..(91)
<223> plastidic promoter Prn16
<400> 46
cgccgtcggt caatgagaat ggataagagg ctccgtgggat tgacgtgagg gggcagggat 60
ggctatattt ctgggagcga actccgggcg a 91
<210> 47
<211> 71
<212> DNA
<213> Nicotiana tabacum
<220>
<221> promoter
<222> (1)..(71)
<223> plastidic promoter PaccD-129
<400> 47
gtcgacatat tattttaaat aatataaagg gggttccaac atattaatat atagtgaagt 60
gttcggatc c 71
<210> 48
<211> 27
<212> DNA
<213> Nicotiana tabacum
<220>
<221> promoter
<222> (1)..(27)
<223> plastidic promoter PclpP-53
<400> 48
agacaataaa aaaaattggt acgtttc 27
<210> 49
<211> 65
<212> DNA
<213> Nicotiana tabacum
<220>
<221> promoter
<222> (1)..(65)
<223> plastidic promoter Prn-62
<400> 49
gagcgaactc cgggcgaata tgaagcgcgt ggatacaagt tatgccttgg aatgaaagac 60
aattc 65

<210> 50
<211> 107
<212> DNA
<213> Nicotiana tabacum
<220>
<221> promoter
<222> (1)..(107)
<223> plastidic promoter Prps16
<400> 50
tctatatata tttatatatt aatatattaat taatatgtta gataaattaa tattagcgat 60
ggggtcttac taaagaaaaa tatttatcca cctatctcta tagtata 107
<210> 51
<211> 47
<212> DNA
<213> Nicotiana tabacum
<220>
<221> promoter
<222> (1)..(47)
<223> plastidic promoter PatpB/E-290
<400> 51
agaaatagaa aataaagttc aggttcgaat tccatagaat agataat 47
<210> 52
<211> 25
<212> DNA
<213> Nicotiana tabacum
<220>
<221> promoter
<222> (1)..(25)
<223> plastidic promoter PrpoB-345
<400> 52
aatgtgtatt atcataataa tggta 25
<210> 53
<211> 35
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: consensus
sequence of E.coli sigma70 promoter
<400> 53
ttgacattca ctcttcaatt atctataatg ataca 35
<210> 54
<211> 80
<212> DNA
<213> Nicotiana tabacum
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(80)
<223> 5'-untranslated region of psbA gene (incl. NcoI
site)
<400> 54
tccattttct attttgattt gtagaaaact agtgtgcttg ggagtccttg atgattaaat 60
aaaccaagat tttacatgg 80

<210> 55
<211> 40
<212> DNA
<213> Nicotiana tabacum
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(40)
<223> 5'-untranslated region of rbcL gene
<400> 55
agttgtaggg agggattcat gacaccacaa acagccatgg 40
<210> 56
<211> 22
<212> DNA
<213> Nicotiana tabacum
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> 5'-untranslated region of rbcLs gene (modified)
<400> 56
agttgtaggg agggattcat ga 22
<210> 57
<211> 127
<212> DNA
<213> Synechocystis sp.
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(127)
<223> 3'-untranslated region of synechcystis psbA-1 gene
<400> 57
tgccattgcc ataactgctt tccggttagac ttcgtttcat ttggttaatc aagggcactc 60
tcgcaatggg gtgcctttta tggccaagg ttaaagtaa gccagtacta tttctagggt 120
gaaatgt 127
<210> 58
<211> 90
<212> DNA
<213> Nicotiana tabacum
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(90)
<223> 3'-untranslated region of tobacco psbA gene
<400> 58
cctggcctag tctataggag gttttgaaaa gaaaggagca ataatcattt tcttgttcta 60
tcaagagggt gctattgctc ctttcttttt 90
<210> 59
<211> 136
<212> DNA
<213> Nicotiana tabacum
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(136)
<223> 3'-untranslated region of tobacco rbcL gene
<400> 59
agtagacatt agcagataaa ttagcaggaa ataaagaagg ataaggagaa agaactcaag 60

taattatcct tcgttctctt aattgaattg caattaaact cggcccaatc ttttactaaa 120
aggattgagc cgaata 136

<210> 60

<211> 13

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetic
ribosome binding site (RBS)

<400> 60

ggaggnnnnn atg

13

<210> 61

<211> 13

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetic
ribosome binding site (RBS)

<400> 61

ggaggatctc atg

13

<210> 62

<211> 1494

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: complete
insert of vector pCB304-25

<400> 62

ggtaccgggc cgataattcc tggcctagtc tataggaggt tttgaaaaga aaggagcaat 60
aatcattttc ttgttctatc aagaggggtgc tattgctcct ttcttttttt ctcgagtacg 120
ctagggataa cagggttaata tagaagcttg actctcttaa agatctcgac tctatatata 180
tttatatatt aaatattaat taatatgtta gataaattaa tattagcgat ggggtcttac 240
taaagaaaaa tatttatcca cctatctcta tagtatatag gatctagttg tagggaggga 300
ttcatgacac cacaacacgc catgggagct tggattgaac aagatggatt gcacgcaggt 360
tctccggccg cttgggtgga gaggtatctt ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc 420
tgctctgatg ccgctgtgtt ccggtgtgca ggcagggggc gcccggttct ttttgtcaag 480
accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg caggacgagg cagcgcggtc atcgtggctg 540
gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctcgacgttg tctactgaagc gggaaggggac 600
tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc 660
gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcgggtgc atacgcttga tccggctacc 720
tgcccatctg accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc 780
ggtcttgctg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg 840
ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccgac ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat 900
gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggcgcgtttt ctggattcat cgactgtggc 960
cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctaccctgta tattgctgaa 1020
gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc cgtccccgat 1080
tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg acccaagcta 1140
ggcggcccgcg gatccaagct tgaattcagt agacattagc agataaatta gcaggaaata 1200
aagaaggata aggagaaaga actcaagtaa ttatccttcg ttctcttaat tgaattgcaa 1260
ttaaactcgg cccaatcttt tactaaaagg attgagccga atactcgact taaggtagcg 1320
tcgagtacgc gcccggggag cccaagggca cgccctggca cccgaagctc tagtatcaaa 1380
tttggcacia aaagcaaaat taaaatactg ataattgcca acacaattaa catctcaatc 1440
aaggtaaatg ctttttgctt tttttgcaa agctatcttc cgtgatcaga gctc 1494

<210> 63
 <211> 592
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: BglIII / MnlI
 fragment from vector pCB320-192

<400> 63
 agatcttcca ttttctattt tgattttagt aaaactagtg tgcttgggag tccctgatga 60
 ttaaataaac caagatttta ccatggcgct caccaatgct caaatcttgg ctgtgattga 120
 cagttgggaa gaaacagtcg gtcagtttcc agtgataacg caccatgtac cattaggtgg 180
 cggctctgcaa ggaacgctcc attgttacga gatcccccta gcagctcctt atgggggttg 240
 ctttgctaag aatgggccta cccgctggca atacaaacgg acaatcaatc aagtcgtcca 300
 cagatggggg tcccacacag tcccttttct attagaaccg gataacatca acggcaaac 360
 ctgcacagca tcgcacctat gtcataatac tcgatgccac aatcccttgc acttgtgctg 420
 ggagtcacta gacgacaaca aaggcagaaa ctggtgcccc ggtcccaacg ggggatgtgt 480
 ccatgcggtg gtttgtttaa ggcaggggtcc gttgtacggc ccaggggcga ctgtggcagg 540
 tcctcaacaa aggggcagtc actttgtggt ataactgcag aagcttcaat tg 592

<210> 64
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer

<400> 64
 aaagatctcc tcacaaaggg ggtcg

25

<210> 65
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer

<400> 65
 tcgaagactt aggaccgtta tag

23

<210> 66
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer

<400> 66
 aggaagacct tgtcgggtaa gttccg

26

<210> 67
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer

<400> 67'
 ctcaattggg gtctctctgt ccaggtgcag g 31
 <210> 68
 <211> 672
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: artificial
 fusion protein of I-Ppo I homing endonuclease and
 plastidic transit peptide
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(669)
 <400> 68
 atg tct gct tct tct tta ttt aat ctc cca ttg att cgc ctc aga tct 48
 Met Ser Ala Ser Ser Leu Phe Asn Leu Pro Leu Ile Arg Leu Arg Ser
 1 5 10 15
 ctc gct ctt tcg tct tct ttt tct tct ttc cga ttt gcc cat cgt cct 96
 Leu Ala Leu Ser Ser Ser Phe Ser Ser Phe Arg Phe Ala His Arg Pro
 20 25 30
 ctg tca tcg att tca ccg aga aag tta ccg aat ttt cgt gct ttc tct 144
 Leu Ser Ser Ile Ser Pro Arg Lys Leu Pro Asn Phe Arg Ala Phe Ser
 35 40 45
 ggt acc gct atg aca gat act aaa gat ggg atc ccc atg gcg ctc acc 192
 Gly Thr Ala Met Thr Asp Thr Lys Asp Gly Ile Pro Met Ala Leu Thr
 50 55 60
 aat gct caa atc ttg gct gtg att gac agt tgg gaa gaa aca gtc ggt 240
 Asn Ala Gln Ile Leu Ala Val Ile Asp Ser Trp Glu Glu Thr Val Gly
 65 70 75 80
 cag ttt cca gtg ata acg cac cat gta cca tta ggt ggc ggt ctg caa 288
 Gln Phe Pro Val Ile Thr His His Val Pro Leu Gly Gly Gly Leu Gln
 85 90 95
 gga acg ctc cat tgt tac gag atc ccc cta gca gct cct tat ggg gtt 336
 Gly Thr Leu His Cys Tyr Glu Ile Pro Leu Ala Ala Pro Tyr Gly Val
 100 105 110
 ggc ttt gct aag aat ggg cct acc cgc tgg caa tac aaa cgg aca atc 384
 Gly Phe Ala Lys Asn Gly Pro Thr Arg Trp Gln Tyr Lys Arg Thr Ile
 115 120 125
 aat caa gtc gtc cac aga tgg ggg tcc cac aca gtc cct ttt cta tta 432
 Asn Gln Val Val His Arg Trp Gly Ser His Thr Val Pro Phe Leu Leu
 130 135 140
 gaa ccg gat aac atc aac ggc aaa acc tgc aca gca tcg cac cta tgt 480
 Glu Pro Asp Asn Ile Asn Gly Lys Thr Cys Thr Ala Ser His Leu Cys
 145 150 155 160
 cat aat act cga tgc cac aat ccc ttg cac ttg tgc tgg gag tca cta 528
 His Asn Thr Arg Cys His Asn Pro Leu His Leu Cys Trp Glu Ser Leu
 165 170 175
 gac gac aac aaa ggc aga aac tgg tgc ccc ggt ccc aac ggg gga tgt 576
 Asp Asp Asn Lys Gly Arg Asn Trp Cys Pro Gly Pro Asn Gly Gly Cys
 180 185 190
 gtc cat gcg gtg gtt tgt tta agg cag ggt ccg ttg tac ggc cca ggg 624
 Val His Ala Val Val Cys Leu Arg Gln Gly Pro Leu Tyr Gly Pro Gly
 195 200 205

gcg act gtg gca ggt cct caa caa agg ggc agt cac ttt gtg gta taa 672
 Ala Thr Val Ala Gly Pro Gln Gln Arg Gly Ser His Phe Val Val
 210 215 220

<210> 69

<211> 223

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: artificial
 fusion protein of I-Ppo I homing endonuclease and
 plastidic transit peptide

<400> 69

Met Ser Ala Ser Ser Leu Phe Asn Leu Pro Leu Ile Arg Leu Arg Ser
 1 5 10 15
 Leu Ala Leu Ser Ser Ser Phe Ser Ser Phe Arg Phe Ala His Arg Pro
 20 25 30
 Leu Ser Ser Ile Ser Pro Arg Lys Leu Pro Asn Phe Arg Ala Phe Ser
 35 40 45
 Gly Thr Ala Met Thr Asp Thr Lys Asp Gly Ile Pro Met Ala Leu Thr
 50 55 60
 Asn Ala Gln Ile Leu Ala Val Ile Asp Ser Trp Glu Glu Thr Val Gly
 65 70 75 80
 Gln Phe Pro Val Ile Thr His His Val Pro Leu Gly Gly Gly Leu Gln
 85 90 95
 Gly Thr Leu His Cys Tyr Glu Ile Pro Leu Ala Ala Pro Tyr Gly Val
 100 105 110
 Gly Phe Ala Lys Asn Gly Pro Thr Arg Trp Gln Tyr Lys Arg Thr Ile
 115 120 125
 Asn Gln Val Val His Arg Trp Gly Ser His Thr Val Pro Phe Leu Leu
 130 135 140
 Glu Pro Asp Asn Ile Asn Gly Lys Thr Cys Thr Ala Ser His Leu Cys
 145 150 155 160
 His Asn Thr Arg Cys His Asn Pro Leu His Leu Cys Trp Glu Ser Leu
 165 170 175
 Asp Asp Asn Lys Gly Arg Asn Trp Cys Pro Gly Pro Asn Gly Gly Cys
 180 185 190
 Val His Ala Val Val Cys Leu Arg Gln Gly Pro Leu Tyr Gly Pro Gly
 195 200 205
 Ala Thr Val Ala Gly Pro Gln Gln Arg Gly Ser His Phe Val Val
 210 215 220

<210> 70

<211> 558

<212> DNA

<213> Physarum polycephalum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(555)

<223> coding for long version of I-PpoI

<400> 70

atg gcg aaa tcc aac caa gct cgg gta aac ggc ggg agt aac tat gac 48

25

Met	Ala	Lys	Ser	Asn	Gln	Ala	Arg	Val	Asn	Gly	Gly	Ser	Asn	Tyr	Asp	
1				5					10					15		
tct	ctc	acc	ccc	tta	aat	atg	gcg	ctc	acc	aat	gct	caa	atc	ttg	gct	96
Ser	Leu	Thr	Pro	Leu	Asn	Met	Ala	Leu	Thr	Asn	Ala	Gln	Ile	Leu	Ala	
			20					25					30			
gtg	att	gac	agc	tgg	gaa	gaa	aca	gtc	ggg	cag	ttt	cca	gtg	ata	acg	144
Val	Ile	Asp	Ser	Trp	Glu	Glu	Thr	Val	Gly	Gln	Phe	Pro	Val	Ile	Thr	
		35					40				45					
cac	cat	gta	cca	tta	ggg	ggc	ggg	ctg	caa	gga	acg	ctc	cat	tgt	tac	192
His	His	Val	Pro	Leu	Gly	Gly	Gly	Leu	Gln	Gly	Thr	Leu	His	Cys	Tyr	
	50					55					60					
gag	atc	ccc	cta	gca	gct	cct	tat	ggg	gtt	ggc	ttt	gct	aag	aat	ggg	240
Glu	Ile	Pro	Leu	Ala	Ala	Pro	Tyr	Gly	Val	Gly	Phe	Ala	Lys	Asn	Gly	
65					70					75					80	
cct	acc	cg	tgg	caa	tac	aaa	cg	aca	atc	aat	caa	gtc	gtc	cac	aga	288
Pro	Thr	Arg	Trp	Gln	Tyr	Lys	Arg	Thr	Ile	Asn	Gln	Val	Val	His	Arg	
			85						90					95		
tgg	gga	tcc	cac	aca	gtc	cct	ttt	cta	tta	gaa	ccg	gat	aac	atc	aac	336
Trp	Gly	Ser	His	Thr	Val	Pro	Phe	Leu	Leu	Glu	Pro	Asp	Asn	Ile	Asn	
			100					105					110			
ggc	aaa	acc	tgc	aca	gca	tgc	cac	cta	tgt	cat	aat	act	cga	tgc	cac	384
Gly	Lys	Thr	Cys	Thr	Ala	Ser	His	Leu	Cys	His	Asn	Thr	Arg	Cys	His	
		115					120					125				
aat	ccc	ttg	cac	ttg	tgc	tgg	gag	tca	cta	gac	gac	aac	aaa	ggc	aga	432
Asn	Pro	Leu	His	Leu	Cys	Trp	Glu	Ser	Leu	Asp	Asp	Asn	Lys	Gly	Arg	
	130					135					140					
aac	tgg	tgc	ccg	ggg	ccc	aac	ggg	gga	tgt	gtc	cat	gcg	gtg	gtt	tgt	480
Asn	Trp	Cys	Pro	Gly	Pro	Asn	Gly	Gly	Cys	Val	His	Ala	Val	Val	Cys	
145					150					155					160	
tta	agg	cag	ggg	ccg	ttg	tac	ggc	ccg	ggg	gcg	act	gtg	gca	ggg	cct	528
Leu	Arg	Gln	Gly	Pro	Leu	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ala	Thr	Val	Ala	Gly	Pro	
			165					170						175		
caa	caa	agg	ggc	agt	cac	ttt	gtg	gta	taa							558
Gln	Gln	Arg	Gly	Ser	His	Phe	Val	Val								
			180					185								

<210> 71

<211> 185

<212> PRT

<213> Physarum polycephalum

<400> 71

Met	Ala	Lys	Ser	Asn	Gln	Ala	Arg	Val	Asn	Gly	Gly	Ser	Asn	Tyr	Asp	
1				5					10					15		
Ser	Leu	Thr	Pro	Leu	Asn	Met	Ala	Leu	Thr	Asn	Ala	Gln	Ile	Leu	Ala	
			20					25					30			
Val	Ile	Asp	Ser	Trp	Glu	Glu	Thr	Val	Gly	Gln	Phe	Pro	Val	Ile	Thr	
		35					40				45					
His	His	Val	Pro	Leu	Gly	Gly	Gly	Leu	Gln	Gly	Thr	Leu	His	Cys	Tyr	
	50					55					60					
Glu	Ile	Pro	Leu	Ala	Ala	Pro	Tyr	Gly	Val	Gly	Phe	Ala	Lys	Asn	Gly	
65					70					75					80	

<400> 74
ttacaatttc cattcqqcat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtgcgggc 60

```

ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 120
aacgccaggg ttttcccagt caccgacgtt taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 180
cgactcacta tagggcgaaat tgggtaccgg gccccccctc gaggtcgacg gtatcgataa 240
gcttgacccg acaaggaatt tcgctcgagt actccaaaac taatcaatat actttcgcat 300
acaaattagt tcccagcggc tccagtgttg catcacttca tccgctagct cccattaagg 360
agaggtccga ctatatctta tgagaagaat acatcttccc cgaccgacat ttagtctgtg 420
aactgcatcc atatcaacag aagatctgtt gacttaggac ttggctgctg ggttaggacc 480
atgtccgtca gcttattacc ataccctttg caaggccatc tcaaagtttc ccctgagact 540
tggtactgaa cggctgttga cccctttccc gcaatttgac ggtcttgctt tttaaaccga 600
tgcaatctat tggtttaaag actagctacc aggtgcatgc ctgataactt ttaaggcaa 660
cgaaaaatat tgctatttac cttaggaccg ttaggatcca ctagttctag agcggccgcc 720
accgcggttg agctccagct tttgttccct ttagtgaggg ttaattgcgc gcttggcgta 780
atcatggtca t 791

```

<210> 75

<211> 1291

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: insert of
vector pCB478-3

<400> 75

```

ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaaggcgat cgggtgcgggc 60
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 120
aacgccaggg ttttcccagt caccgacgtt taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 180
cgactcacta tagggcgaaat tgggtaccgg gccccccctc gaggtcgacg gtatcgataa 240
gcttgacccg acaaggaatt tcgctcgagt actccaaaac taatcaatat actttcgcat 300
acaaattagt tcccagcggc tccagtgttg catcacttca tccgctagct cccattaagg 360
agaggtccga ctatatctta tgagaagaat tttgatcctt actcgccagt ttcttcaaaa 420
cgtttgatag gttcctggta gtttttctca ttgatacgga gtttttttgc taaatccaac 480
actttctcga atccttctcg cgattctaaa tgtctacctg cttttaacag caagcagatt 540
tttcgaaatc gaagaaatc aattcttctt tttgttttta gtcctggtt ttcgaaaaat 600
ggtataatga cggttataaa gtgatcaata tttttgactt tatagcaaag ccgttcccca 660
tgattcacia cgactgatcc aactttaaag tagtctttta atgcatataa aacatttgca 720
tctaatttat gttgggtcac tacgaattaa ttctggttga agctgatggc catagcgcaa 780
cgaattattt ctaagtatac ttacactaaa acaaccttcc ccatctacga aacctgtaac 840
ccattgagga ttaatgtcca tgggtccctc ctacaacgtc tgcagatcaa acatcttccc 900
cgaccgacat ttagtctgtg aactgcatcc atatcaacag aagatctgtt gacttaggac 960
ttggctgctg ggttaggacc atgtccgtca gcttattacc ataccctttg caaggccatc 1020
tcaaagtttc ccctgagact tggtaactgaa cggctgttga cccctttccc gcaatttgac 1080
ggtcttgctt tttaaaccga tgcaatctat tggtttaaag actagctacc aggtgcatgc 1140
ctgataactt ttaaggcaa cgaaaaatat tgctatttac cttaggaccg ttaggatcca 1200
ctagttctag agcggccgcc accgcggttg agctccagct tttgttccct ttagtgaggg 1260
ttaattgcgc gcttggcgta atcatggtca t 1291

```

<210> 76

<211> 1386

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: insert of
vector pCB492-25

<400> 76

```

gcgcgcgtaa tacgactcac tatagggcga attgggggag actgtttacc aaaaacacag 60
gtctccgcaa agtcgtaaga ccatgtatgg gggctgacgc ctgcccagtg ccggaaggtc 120
aaggaagttg gtgacctgat gacaggggag ccggcgaccg aagccccggt gaacggcggc 180
cgtaactata acggtcctaa ggtaaatagc aatatttttc gttgccttaa aaagttatca 240

```

```

ggcatgcacc tggtagctag tcttttaaacc aatagattgc atcggtttta aaggcaagac 300
cgtcaaatg cggaaggg gtcaacagcc gttcagtacc aagtctcagg ggaaactttg 360
agatggcctt gcaaagggta tggtaataag ctgacggaca tggtcctaac cagcgagcca 420
agtcttaagt caacagatct tctgttgata tggatgcagt tcacagacta aatgtcggtc 480
ggggaagatg tttgatctgc agacgttgta gggagggacc atggacatta atcctcaatg 540
gattacaggt ttcgtagatg gggaagggtg ttttagtgta agtatactta gaaataattc 600
gttgcgctat ggccatcagc ttcaaccaga attcgtagtg acccaacata aattagatgc 660
aaatgtttta tatgcattaa aagactactt taaagttgga tcagtctgtg tgaatcatgg 720
ggaacggctt tgctataaag tcaaaaatat tgatcacttt ataaccgtca ttataccatt 780
tttcgaaaaa catgagctaa aaacaaaaag aagaattgaa tttcttcgat ttcgaaaaat 840
ctgcttgctg ttaaaagcag gtagacattt agaatcgag gaaggattcg agaaagtgtt 900
ggatttagca aaaaaactcc gtatcaatga gaaaaactac caggaatcta tcaaacgttt 960
tgaagaaact ggcgagtaag gatcaaaatt cttctcataa gatatagtcg gacctctcct 1020
taatgggagc tagcggatga agtgatgcaa cactggagcc gctgggaact aatttgtatg 1080
cgaaagtata ttgattagtt ttggagtact cgagcgaaat tccttgtcgg gtaagttccg 1140
acccgcacga aaggcgtaac gatctgggca ctgtctcgga gagaggctcg gtgaaataga 1200
catgtctgtg aagatgcgga ctacctgcac ctggacagag agacccaat tcctggccta 1260
gtctatagga ggttttgaaa agaaaggagc aataatcatt ttcttgttct atcaagaggg 1320
tgctattgct cctttctttt tttctcgacc agcttttgtt ccttttagtg agggttaatt 1380
gcgcgc

```

<210> 77

<211> 60

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 77

tagtaaatga caattttcct ctgaattata taattaacat ggcgactgtt taccaaaaac 60

<210> 78

<211> 31

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 78

ctcaattggg gtctctctgt ccagggtgcag g

31

<210> 79

<211> 1258

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR product
Prom-TetIVS2a-Cpa

<400> 79

```

tagtaaatga caattttcct ctgaattata taattaacat ggcgactgtt taccaaaaac 60
acaggtctcc gcaaagtcgt aagaccatgt atgggggctg acgcctgccc agtgccggaa 120
ggatcaaggaa gttggtgacc tgatgacagg ggagccggcg accgaagccc cgggtgaacgg 180
cggccgtaac tataacggtc ctaaggtaaa tagcaatatt tttcgttgcc ttaaaaagtt 240
atcaggcatg cacctggtag ctagtcttta aaccaataga ttgcatcggg ttaaaaggca 300
agaccgtcaa attgcgggaa aggggtcaac agccgttcag taccaagtct caggggaaac 360
tttgagatgg ccttgcaaag ggtatggtaa taagctgacg gacatggtec taaccacgca 420
gccaaagtcc aagtcaacag atcttctgtt gatatggatg cagttcacag actaaatgtc 480

```

```

ggtcgggggaa gatgtttgat ctgcagacgt tgtagggagg gaccatggac attaatcctc 540
aatggattac aggtttcgtat gatggggaag gttgttttag tgtaagtata cttagaaata 600...
attcgttgcg ctatggccat cagcttcaac cagaattcgt agtgaccaa cataaattag 660
atgcaaatgt tttatatgca ttaaaagact actttaaaagt tggatcagtc gttgtgaatc 720
atggggaacg gctttgctat aaagtcaaaa atattgatca ctttataacc gtcattatac 780
catttttcga aaaacatgag ctaaaaacaa aaagaagaat tgaatttctt cgatttcgaa 840
aaatctgctt gctgttaaaa gcaggtagac atttagaatc gcaggaagga ttcgagaaag 900
tgttggattt agcaaaaaaa ctccgtatca atgagaaaaa ctaccaggaa tctatcaaac 960
gttttgaaga aactggcgag taaggatcaa aattcttctc ataagatata gtcggacctc 1020
tccttaatgg gagctagcgg atgaagtgat gcaacactgg agccgctggg aactaatttg 1080
tatgcgaaag tatattgatt agttttggag tactcgagcg aaattccttg tcgggtaagt 1140
tccgaccgcg acgaaaggcg taacgatctg ggcactgtct cggagagagg ctcggtgaaa 1200
tagacatgtc tgtgaagatg cggactacct gcacctggac agagagaccc caattgag 1258

```

<210> 80

<211> 4746

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: insert of vector pCB435-45

<400> 80

```

gcgccaata cgaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagtgatga 60
cttgacggca tcctcacctt cctccggctt atcaccggca gtctgttcag ggttccaaac 120
tcaacgatgg caactaaaca cgagggttgc gtcgttgccg ggacttaacc caacacctta 180
cggcacgagc tgacgacagc catgcaccac ctgtgtccgc gttcccgaag gcacccctct 240
ctttcaagag gattcgcggc atgtcaagcc ctggttaagg tcttcgcttt gcacgaatt 300
aaaccacatg ctccaccgct tgtgcgggcc ccgctcaatt ccttttagtt tcattcttgc 360
gaacgtactc ccagggcggg atacttaacg cgttagctac agcactgcac gggctgatac 420
gcacagcgcc tagtatccat cgtttacggc taggactact ggggtatcta atcccattcg 480
ctcccctagc tttcgtctct cagtgtcagt gtccggccag cagagtgttt tcgccgttgg 540
tgttcctttc gatctctacg catttcaccg ctccaccgga aattccctct gccctaccg 600
tactccagct tggtagtttc caccgcctgt ccagggttga gccctgggat ttgacggcgg 660
acttaaaaag ccacctacag acgctttacg cccaatcatt ccggataacg cttgcacctc 720
ctgtattacc gcggctgctg gcacagagtt agccgatgct tattccccag ataccgtcat 780
tgcttcttct ccgggaaaag aagttcacga ccgctgggccc ttctacctcc acgcggcatt 840
gctccgtcag gctttcgccc attgcggaag attccccact gctgcctccc gtaggagctc 900
gggccgtgtc tcagtcccag tgtggctgat catcctctcg gaccagctac tgatcatcgc 960
cttggttaagc tattgcctca ccaactagct aatcagacgc gagcccctcc tcgggcggat 1020
tcctcctttt gctcctcagc ctacggggta ttagcagccg tttccagctg ttgttcccct 1080
cccaagggca ggttcttacg cgttactcac ccgtccgcca ctggaaacac cacttcccgt 1140
ccgacttgca tgtgttaagc atgccgccag cgttcatcct gagccaggat cgaactctcc 1200
atgagattca tagttgcatt acttatagct tccttggtcg tagacaaagc ggattcggaa 1260
ttgtctttca ttccaaggca taacttgat ccattgcgct catattcgcc cggagtctgc 1320
tcccagaaat atagccatcc ctgccccctc acgtcaatcc caccagcctc ttatccattc 1380
tcattgaacg acggcggggg agcgcgggcc cccctcgac atatatatta aataatataa 1440
agggggttcc aacatattaa tatatagtga agtgttccgg atccactagg acgttgtagg 1500
gagggaccat ggacattaat cctcaatgga ttacaggttt cgtagatggg gaagggtgtt 1560
ttagtgtaag tatacttaga aataattcgt tgcgctatgg ccacagctt caaccagaat 1620
tcgtagtgc ccaacataaa ttagatgcaa atgttttata tgcattaaaa gactacttta 1680
aagttggatc agtcgttggt aatcatgggg aacggctttg ctataaagtc aaaaatattg 1740
atcactttat aaccgtcatt ataccatttt tcgaaaaaca tgagctaaaa acaaaaagaa 1800
gaattgaatt tcttcgattt cgaaaaatct gcttgctgtt aaaagcaggt agacatttag 1860
aatcgcagga aggattcgag aaagtgttgg atttagcaaa aaaactccgt atcaatgaga 1920
aaaactacca ggaatctatc aaacgttttg aagaaactgg cgagtaactc gagaaaaaaa 1980
gaaaggagca atagcacctt cttgatagaa caagaaaatg attattgctc ctttcttttc 2040
aaaacctcct atagactagg ccaggaatta tctgcagtta tttgccaaat accttagtga 2100

```

```

tctcgccttt cactagtggtg acaaattctt ccaactgac tgccgcgcgag gccaaagcgat 2160
cttcttcttg tccaagataa gcctgtctag cttcaagtat gacgggctga tactggggccg 2220
gcaggcgctc cattgcccag tcggcagcga catecttcgg cgcgattttg ccggttactg 2280
cgctgtacca aatgcgggac aacgtaagca ctacatttcg ctcatcgcca gccagtcgg 2340
gcggcgagtt ccatagcggtt aagggttcat ttagcgctc aaatagatcc tgttcaggaa 2400
ccggatcaaa gaggttcctc gccgctggac ctaccaaggc aacgctatgt tctcttgctt 2460
ttgtcagcaa gatagccaga tcaatgtcga tcgtggctgg ctggaagata cctgcaagaa 2520
tgtcattgct ctgccattct ccaaattgca gttcgcgctt agctggataa cgccacggaa 2580
tgatgtcgtc gtgcacaaca atggtgactt ctacagcgcg gagaatctcg ctctctccag 2640
gggaagccga agtttccaaa aggtcgttga tcaaagctcg ccgctgtgtt tcatcaagcc 2700
ttaagggtcac cgtaaccagc aaatcaatat cactgtgtgg cttcaggccg ccatccactg 2760
cggagccgta caaatgtacg gccagcaacg tcggttcgag atggcgctcg atgacgcaa 2820
ctacctctga tagttgagtt gatacttcgg cgataaccgc ttacagagcc atgaatccct 2880
ccctacaact agatcctcgc ccggagttcg ctcccagaaa tatagccatc cctgccccct 2940
cacgtcaatc ccacgagcct cttatccatt ctcatgaac gacggcgctg agggggggcc 3000
cggtagcaaaa tccaactaga aaaactcaca ttgggcttag ggataatcag gctcgaactg 3060
atgacttcca ccacgtcaag gtgacactct accgctgagt tatatccctt ccccgcccca 3120
tcgagaaata gaactgacta atcctaagtc aaagggtcga gaaactcaac gccactatc 3180
ttgaacaact tggagccggg ccttcttttc gcactattac ggatatgaaa ataatggtca 3240
aaatcggatt caattgtcaa ctgcccctat cggaaatagg attgactacc gattccgaag 3300
gaactggagt tacatctctt ttccattcaa gagttcttat gcgtttccac gcccttttga 3360
gaccccgaaa aatggacaaa ttctttttct taggaacaca tacaagattc gtcactaaa 3420
aaaggataat ggtaacccta ccattaacta cttcatttat gaatttcata gtaatagaaa 3480
tacatgtcct accgagacag aatttggaac ttgctatcct cttgcctagc aggcgaagat 3540
ttacctcgt ggaaaggatg attcattcgg atcgacatga gagtccaact acattgccag 3600
aatccatgtt gtatatgtga aagagggtga cctccttgct tctctcatgg tacactcctc 3660
ttcccgccga gcccttttct tctcgggtcc acagagacaa aatgtaggac tggtgccaac 3720
aattcatcag actcactaag tcgggatcac taactaatac taatctaata taatagtcta 3780
atatatctaa tataatagaa aataactaata taatagaaaa gaactgtctt ttctgtatac 3840
tttccccggg tccgttgcta ccgagggcct cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt 3900
catgacaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa 3960
gatcaaaaga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgtgct tgcaaacaaa 4020
aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttggtt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc 4080
gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta 4140
gttaggccac cactcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaactct 4200
gttaccagt gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttg actcaagacg 4260
atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag 4320
cttgagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc 4380
cacgttccc gaaggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg 4440
agagcgcagc agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt 4500
tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg 4560
gaaaaacgcc agcaacgcgg ccttttttac gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca 4620
catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg 4680
agctgatacc gtcgcccga gccgaacgac cgagcgcagc gagtcaagtga gcgaggaagc 4740
ggaaga 4746

```

<210> 81

<211> 1213

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: probe for
Southern blot analysis (16SrDNA)

<400> 81

```

ttatcacccg cagtctgttc agggttccaa actcaacgat ggcaactaaa caccaggggtt 60
gcgctcgttg cgggacttaa cccaacacct tacggcacga gctgacgaca gccatgcacc 120
acctgtgtcc gcgttcccga aggcacccct ctctttcaag aggattcgcg gcatgtcaag 180

```



```

ccctggttaag gttcttctgct ttgcatcgaa ttaaaccaca tgctccaccg cttgtgcggg 240
cccccgtaaa ttcttttttag ttctattctt gcgaacgtac tccccaggcg ggatacttaa 300
cgcggttagct acagcactgc acgggtcgat acgcacagcg cctagtatcc atcggtttacg 360
gctaggacta ctgggggtatc taatcccatt cgctccccta gctttcgtct ctcagtgtca 420
gtgtcggccc agcagagtgc tttcgccgtt ggtgttcttt ccgatctcta cgcatttcac 480
cgctccaccg gaaattccct ctgcccctac cgtactccag cttggtagtt tccaccgcct 540
gtccagggtt gagccctggg atttgacggc ggacttaaaa agccacctac agacgcttta 600
cgcccaatca ttccggataa cgcttgcatc ctctgtatta ccgcggtgc tggcacagag 660
ttagccgatg cttattcccc agataccgtc attgcttctt ctccgggaaa agaagttcac 720
gacccggtggg ctttctacct ccacgcggca ttgctccgtc aggttttcgc ccattgcgga 780
aaattcccca ctgctgcctc ccgtaggagt ctgggcccgtg tctcagtcct agtgtggctg 840
atcatcctct cggaccagct actgatcatc gccttggtaa gctattgcct caccaactag 900
ctaatacagc gcgagcccct cctcggggcg attctcctt ttgctcctca gcctacgggg 960
tattagcagc cgtttccagc tgttggtccc ctcccaaggg caggttctta cgcgttactc 1020
acccgtccgc cactggaac accacttccc gtccgacttg catgtgttaa gcagtcgcc 1080
agcgttcac ctgagccagg atcgaactct ccatgagatt catagttgca ttacttatag 1140
cttccttggt cgtagacaaa gcggattcgg aattgtcttt cattccaagg cataacttgt 1200
atccatgcgc ttc                                     1213

```

<210> 82

<211> 949

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: probe for Southern blot (23SrDNA)

<400> 82

```

catcgctcag agggaaacag cccggatcac cagctaaggc ccctaaatga tcgctcagtg 60
ataaaggagg taggggtgca gagacagcca ggaggtttg ctagaagcag ccacccttga 120
aagagtgcgt aatagctcac tgatcgagcg ctcttgccg gaagatgaac ggggctaagc 180
gatctgccga agctgtggga tgtaaaaata catcggtagg ggagcgttcc gccttagaga 240
gaagcctccg cgcgagcggg ggtggacgaa gcggaagcga gaatgtcggc ttgagtaacg 300
caaacattgg tgagaatcca atgccccgaa aacctaaggg ttcctccgca aggttcgtcc 360
acggagggtg agtcagggcc taagatcagg ccgaaaggcg tagtcgatgg acaacagggtg 420
aatattictg tactgcccct tgttggtccc gagggacgga ggaggctagg ttagccgaaa 480
gatggttatc ggttcaagaa cgtaagggtg ccctgctttg tcagggttag aaggggtaga 540
gaaaatgcct cgagccaatg ttccaatacc aggcgctacg gcgctgaagt aacccatgcc 600
atactcccag gaaaagctcg aacgactttg agcaagaggg tacctgtacc cgaaaccgac 660
acaggtgggt aggtagagaa tacctagggg cgcgagacaa ctctctctaa ggaactcggc 720
aaaatagccc cgtaacttcg ggagaagggg tgctctctca caaagggggt cgcagtgacc 780
aggccccggc gactgtttac caaaaacaca ggtctccgca aagtcgtaag accatgtatg 840
ggggctgacg cctgccagtg gccggaaggt caaggaagtt ggtgacctga tgacagggga 900
gccggcgacc gaagccccgg tgaacggcgg ccgtaactat aacggtcct 949

```

<210> 83

<211> 1287

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: insert of vector pCB456-2

<400> 83

```

gagctctcag tactcgagac atttcaccct agaaatagac ttaaacttta ctggcttaac 60
tttaaccttg gaccataaaa ggcaccccat tgcgagagtg cccttgatta accaaatgaa 120
acgaagtcta accgaaagca gttatggcaa tggcagaatt ctgatcacgg aagatagctt 180
tggcaaaaaa agcaaaaagc atttaccttg attgagatgt taattgtgtt ggcaattatc 240
agtattttta ttttgctttt tgtgccaaat ttgatactag agcttcgggt gccagggcgt 300

```

```

gcccttgggc tccccgggcg cgtactcgac gctaccttaa gagagtcaag ctaattctaa 360
tctgcagtct agcgtgcggc cgctctagaa ctagtggatc ccccgggctg cagttatttg 420...
ccaactacct tagtgatctc gcctttcacg tagtggacaa attcttccaa ctgatctgcg 480
cgcgaggcca agcgatcttc ttcttgteca agataagcct gtctagcttc aagtatgacg 540
ggctgatact gggccggcag gcgctccatt gccagtcgg cagcgacatc cttcggcgcg 600
attttgccgg ttactgcgct gtaccaaagtg cgggacaacg taagcactac atttcgctca 660
tcgccagccc agtcggggcg cgagttccat agcgttaagg ttctatttag cgctcaaat 720
agatcctgtt caggaaccgg atcaaagagt tcctccggcg ctggacctac caaggcaacg 780
ctatgtttctc ttgcttttgt cagcaagata gccagatcaa tgcgatcgt ggctggctcg 840
aagataacctg caagaatgtc attgcgctgc cattctccaa attgcagttc gcgcttagct 900
ggataacgcc acggaatgat gtcgctcgtc acaacaatgg tgacttctac agcgcgagga 960
atctcgctct ctccagggga agccgaagtt tccaaaaggt cgttgatcaa agctcgccgc 1020
gttggtttcat caagccttac ggtcacccgta accagcaaat caatatcact gtgtggcttc 1080
aggccgccat ccactgcgga gccgtacaaa tgtacggcca gcaacgtcgg ttcgagatgg 1140
cgctcgatga cgccaactac ctctgatagt tgagttgata cttcggcgat aaccgcttca 1200
cgagccatga gatcctccag atccatgtat cattatagat aattgaagag tgaatgtcaa 1260
gtcgacctcg agggggggcc cgggtacc

```

<210> 84

<211> 1387

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: insert of
vector pCB528-2

<400> 84

```

ggtaacccag ttaactggag atctcgagga ggtcacatgg gagcttggat tgaacaagat 60
ggattgcacg caggtttctc ggccgcttgg gtggagagggc tattcggcta tgactgggca 120
caacagacaa tcgggtgctc tgatgccgcc gtgttcgggc tgcagcgca ggggcgccc 180
gttctttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg aactgcagga cgaggcagcg 240
cggctatcgt ggctggccac gacgggcgtt ccttgcgtag ctgtgctcga cgttgctact 300
gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgcggg ggcaggatct cctgtcatct 360
caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg 420
cttgatccgg ctacctgcc attcgaccac caagcgaac atcgcatcga gcgagcacgt 480
actcggatgg aagccggtct tgatgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc 540
gcccagccg aactgttcgc caggtcgaag gcgcgcagtc ccgacggcga ggatctcgtc 600
gtgacccatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatgggtg aaaatggccg cttttctgga 660
ttcatcgact gtggccggct ggggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc gttggctacc 720
cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcgt gctttacggt 780
atcgcgcgtc ccgattcgca gcgcacgcgc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga 840
tctagatagg aggtcatcat ggcgctcacc aatgctcaa tcttggtgtg gattgacagt 900
tggaagaaa cagtcggtca gtttccagtg ataacgcacc atgtaccatt aggtggcggt 960
ctgcaaggaa cgctccattg ttacgagatc cccctagcag ctcttatgg ggttggcttt 1020
gctaagaatg ggcctaccg ctggcaatac aaacggacaa tcaatcaagt cgtccacaga 1080
tggggggtccc acacagtccc ttttctatta gaaccggata acatcaacgg caaacctgc 1140
acagcatcgc acctatgtca taatactcga tgccacaatc ccttgactt gtgctgggag 1200
tcactagacg acaacaaagg cagaaactgg tgccccggtc ccaacggggg atgtgtccat 1260
gcggtggttt gtttaaggca ggggtccgtt tacggcccag gggcgactgt ggcaggtcct 1320
caacaaaggg gcagtcactt tgtggtataa ctgcagaagg ttaagccag ttaactgggc 1380
ggagctc

```

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.